



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사학위논문

인간유래 카텔리시딘 펩타이드(LL37)의
항균성 모티프를 고정화한
다기능성 실크피브로인 나노섬유

Multi-functional Silk Fibroin Nanofiber
Immobilized with Antimicrobial Motif of
Human Cathelicidin Peptide (LL37)

2016 년 2 월

서울대학교 대학원
바이오시스템 · 소재학부
바이오소재공학전공
송 대 응

초 록

본 연구에서는 인간유래 카텔리시딘 펩타이드(LL37)가 갖는 항균성 및 다양한 생체활성을 이용하여 다양한 기능성을 갖는 창상피복재를 제조하고자, 전기방사를 통해 제조한 실크피브로인 나노섬유 지지체에 LL37의 항균성 모티프(Cys-KR12)를 EDC/NHS 반응과 티올-말레이미드 반응을 통해 화학적으로 고정화하였다. 고정화 반응 결과 나노섬유의 형태학적 구조가 파괴되지 않고 그대로 유지되었으며, Ellman's assay 결과 모든 조건에서 90% 이상의 높은 반응 수율을 나타냈다. 또한 양전하를 띠는 Cys-KR12의 고정화로 인하여 나노섬유 표면의 전하가 음전하에서 양전하로 바뀌었으며, XPS를 통한 원소 분석 결과에서도 리신과 아르기닌으로 인하여 C-N 결합의 피크와 N/C ratio가 증가하였다. 이를 통해 표면에 Cys-KR12가 성공적으로 고정화되었음을 확인하였다.

Cys-KR12의 고정화 밀도에 따른 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성을 평가한 결과, 고정화 밀도가 0.60 nmol/cm^2 이상인 K200과 K500에서 높은 항균성을 나타냈으며 바이오필름 역시 형성되지 않았다. 더욱이 나노섬유 지지체 표면에 고정화된 Cys-KR12가, 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진하였으며, 지질다당류에 의한 대식세포의 종양괴사인자알파 발현을 효과적으로 억제하였다. 따라서 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체는 항균성뿐만 아니라 다양한 생체활성을 부여할 수 있으므로 다기능성 창상피복재로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

주요어: 실크피브로인, 항균성 펩타이드, 나노섬유, 창상피복재, 고정화

학 번: 2014-20067

목 차

초 록	i
목 차	ii
List of Tables	v
List of Figures	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 문헌연구	6
2.1. 실크피브로인	6
2.1.1. 생체재료로서의 실크피브로인	6
2.1.2. 항균성을 부여한 실크피브로인 지지체	7
2.2. 항균성 펩타이드	8
2.2.1. 항균성 펩타이드의 특징 및 기작	8
2.2.2. 항균성 펩타이드의 다양한 기능성	9
2.2.3. 항균성 펩타이드의 고정화 방법	10
제 3 장 재료 및 방법	12
3.1. 재료	12
3.2. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 제조	12
3.2.1. 전기방사	12

3.2.2. 항균성 펩타이드의 고정화	14
3.3. 표면 특성 분석	14
3.3.1. 형태학적 구조	14
3.3.2. 항균성 펩타이드의 정량	17
3.3.3. 제타 전위 측정	18
3.3.4. 표면 원소 분석	18
3.4. 항균성 평가	19
3.4.1. 박테리아 배양	19
3.4.2. 최소저지농도	19
3.4.3. 지지체의 항균성 평가	20
3.4.4. 지지체의 바이오필름 형성 유무 평가	21
3.5. 세포적합성 평가	21
3.5.1. 세포 배양	21
3.5.2. 세포 독성 평가	22
3.5.3. 세포 증식능 평가	22
3.5.4. 웨스턴 블로팅	23
3.5.5. 면역형광법	25
3.5.6. 효소결합면역흡착측정법	26
3.6. 통계처리	26
 제 4 장 결과 및 고찰	 27
4.1. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 표면 특성	27
4.1.1. 형태학적 구조	27
4.1.2. 고정화 항균성 펩타이드의 정량적 분석	29

4.1.3. 고정화 항균성 펩타이드의 정성적 분석	31
4.2. 고정화 항균성 펩타이드의 항균성	38
4.2.1. 항균성 펩타이드의 최소저지농도	38
4.2.2. 고정화 밀도에 따른 항균성	40
4.2.3. 보관 온도에 따른 항균성	43
4.2.4. 항바이오필름 효과	43
4.3. 고정화 항균성 펩타이드가 세포 거동에 미치는 영향	46
4.3.1. 항균성 펩타이드의 잠재적 세포 독성	46
4.3.2. 각질세포 및 섬유아세포 증식에 미치는 영향	48
4.3.3. 각질세포 분화에 미치는 영향	51
4.3.4. 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향	54
 제 5 장 결 론	 58
 참고문헌	 60
Abstract	80

List of Tables

Table 1	Sample identification with concentrations of Cys-KR12 solution.	16
Table 2	Surface elemental composition of Pristine SF and K200.	37

List of Figures

Figure 1	Chemical structure of Cys–KR12. Peptide sequence is $\text{NH}_2\text{--CKRIVKRIKKWLR--COOH}$. (blue: basic residue, red: hydrophobic residue, green: thiol group of cysteine residue)	13
Figure 2	Reaction scheme for immobilization of Cys–KR12 on SF nanofiber matrix using EDC/NHS and thiol–maleimide chemistry.	15
Figure 3	FE–SEM images of SF nanofiber matrix (A) before and (B) after peptide immobilization; Average fiber diameter and fiber diameter distribution of SF nanofiber matrix (C) before and (D) after peptide immobilization.	28
Figure 4	Immobilization density of Cys–KR12 and reaction yield with various concentrations of Cys–KR12 measured by Ellman’ s assay.	30
Figure 5	Surface zeta potential of Pristine SF, SF–AEM, and K200 measured by ELS at pH 7.0.	32
Figure 6	XPS analysis for characterization of surface elemental composition. Survey scan spectra of (A) Pristine SF and (B) K200; High resolution C1s spectra of (C) Pristine SF and (D) K200.; High resolution N1s spectra of (E) Pristine SF and (F) K200; High resolution O1s spectra of (G) Pristine SF and (H) K200	34

Figure 7	Minimum inhibitory concentrations (MICs) of Cys-KR12 against (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>S. epidermidis</i> , (C) <i>E. coli</i> , and (D) <i>P. aeruginosa</i> measured by broth microdilution method. OD at 600 nm was kinetically measured for monitoring bacterial growth. MIC was 4 μ g/mL for <i>E. coli</i> and 8 μ g/mL for the others.	39
Figure 8	Surface antimicrobial activity of Pristine SF and Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix measured by modified JIS Z 2801 method.	41
Figure 9	Long-term stability of Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix at (A) 4°C and (B) 37°C storage. Bacterial reduction (%) was calculated based on CFU of Pristine SF.	44
Figure 10	FE-SEM images of 24 h-cultured <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> on Pristine SF (left column) and K200 (right column) to observe biofilm formation.	45
Figure 11	Cytotoxicity of Cys-KR12 on human keratinocyte (HaCaT) and human dermal fibroblast (NHDF) cells measured by MTT assay. Relative cell viability was calculated based on non-treated control. LD50 was calculated by DoseResp sigmoidal curve fitting using Origin software.	47
Figure 12	Fold changes in metabolic activity of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: metabolic activity	

on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF on each day.	49
Figure 13 Fold changes in DNA content of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: DNA content on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF on day 10.	50
Figure 14 (A) Western blot analysis and (B) normalized amount of expressed involucrin by human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF.	52
Figure 15 Immunofluorescence images of human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. (red: F-actin, green: involucrin, blue: nuclei)	53
Figure 16 Expression of $\text{TNF-}\alpha$ by mouse macrophage cells (Raw 264.7) stimulated by LPS (10 ng/mL) for 6 h. Cells were cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500 samples prior to LPS stimulation. TCP and Cys-KR12 peptide (20 $\mu\text{g/mL}$) were used as negative and positive control for each. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF after LPS stimulation.	56

제 1 장 서 론

상처 치료는 의료분야에 있어서 가장 중요한 부분 중 하나이다. 미국의 경우, 만성 창상으로 인하여 연간 650만 명의 환자가 발생하고 있으며, 이로 인한 만성 창상 치료에 사용되는 비용이 연간 25억 달러에 이른다[1]. 특히, 피부 상처의 경우 상처 치료가 제대로 이루어지지 않으면 박테리아에 쉽게 감염된다. 박테리아에 감염되면, 염증 반응이 지속되고 콜라겐 합성이 저해될 뿐만 아니라 피부 세포의 재생피화가 늦춰져 결국 상처 치유가 지연된다[2]. 또한 박테리아가 고체 표면에 부착하여 고착화되면 세포외 고분자 물질(extracellular polymeric substances, EPS)로 둘러싸인 형태의 바이오필름을 형성하게 되는데, 이렇게 바이오필름이 형성되면 면역체계나 항생제에 의해 쉽게 제거가 되지 않고, 내독소를 배출하여 패혈증을 유발하며, 심한 경우 사망에 이르기까지 한다[2, 3]. 따라서 박테리아로 인한 감염 및 바이오필름 형성을 예방하는 것이 상처 치료에 있어서 가장 중요한 부분이다.

일반적으로 상처 치료 시 외부로부터 박테리아의 유입을 차단하고 상처를 빠르게 회복시키기 위해서 상처 부위에 창상피복재를 덮어준다. 창상피복재에는 생체적합성이 우수한 다양한 종류의 천연고분자(실크, 셀룰로오스, 젤라틴, 키토산, 알지네이트 등)와 합성고분자(폴리우레탄, 폴리비닐알코올, 폴리락티드, 폴리카프로락톤 등)가 사용되고 있다[4]. 또한 그 제조 형태에 있어서도 나노섬유, 직물, 부직포, 필름, 폼, 하이드로젤,

하이드로콜로이드, 하이드로파이버 등 다양한 형태가 이용되고 있다[5]. 이 중 실크피브로인(silk fibroin, SF)은 실크 단백질의 주요 성분으로, 기계적 강도가 우수하고 면역반응을 잘 일으키지 않을 뿐만 아니라 생체적합성이 매우 우수하여 생체재료로 각광받고 있다[6]. 더욱이, 실크피브로인은 카르복실기, 아민기, 수산기, 페놀기 등 다양한 관능기를 통하여 쉽게 개질이 가능하다는 장점이 있다[7]. 이러한 이유로 실크피브로인을 기반으로 한 외과용 봉합사나 조직공학용 지지체와 같은 의료용 소재에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[6]. 특히, 실크피브로인은 창상피복재로서 우수한 성능을 보이며, 이에 따라 다양한 형태로 제조되었다[8]. 다양한 제조 방법 중 전기방사법을 이용하여 제조한 나노섬유 지지체는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 구조를 모사할 수 있을 뿐만 아니라 비표면적이 넓어 재료 표면의 개질을 용이하게 해준다는 장점을 갖고 있어, 창상피복재의 제조에 있어 전기방사법이 많이 이용되고 있다[5, 9]. 하지만 실크피브로인 단독으로는 항균성을 갖지 못하기 때문에, 전기방사한 실크피브로인 나노섬유를 창상피복재로 적용함에 있어 항균성 부여를 위한 개질이 반드시 필요하다[10].

일반적으로 피부 상처나 창상피복재의 박테리아 감염 및 바이오필름 형성을 예방하기 위해서 페니실린이나 메티실린과 같은 항생제를 사용해왔다. 하지만 기존 항생제에 대해 내성을 갖는 박테리아가 보고됨에 따라, 기존 항생제의 사용량은 줄어들고 있다[11]. 이에 대한 대안으로 다양한 항균성 물질(사차암모늄 화합물[12], 은 이온 혹은 은 나노입자[13], 키토산과 같은 항균성 고분자[14] 등)을 상처 치료에 시도해왔다. 특히, 은을 함유하는

물질은 우수한 항균성을 갖는 것으로 보고되었다[15]. 하지만 이러한 항균성 물질들 역시 세포 독성이 존재하고 효능이 낮다는 단점이 존재한다[12, 13, 16-18].

이러한 이유로 최근에는 항균성 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)가 항생제의 새로운 대안으로 각광받고 있다. 항균성 펩타이드는 포유류나 곤충, 어류, 양서류, 박테리아 등 다양한 생물체 내에 존재하는 물질로, 외부에서 침입한 박테리아나 곰팡이, 바이러스 등으로부터 생체를 보호하는 기능을 하고 있다[19, 20]. 항균성 펩타이드는 다양한 구조를 갖고 있지만, 주로 알파나선 구조에 양친매성 도메인을 가지며 양전하를 띠는 특징을 갖는다. 그리고 이러한 양친매성 도메인과 양이온성의 구조적 특징을 통해 박테리아의 세포막을 파괴시킴으로써 항균성을 갖는다고 알려져 있다[19, 20]. 또한 항균성 펩타이드는 박테리아에 항균기작을 나타내는 시간이 빠를 뿐만 아니라 효능이 우수하며, 다양한 미생물에 대해 항균성을 나타내는 장점이 있다. 더욱이 항균성 펩타이드는 이미 생체 내에서 미생물에 대한 방어 기작으로 작용하고 있기 때문에, 기존 항생제의 가장 큰 문제점이었던 내성이 아직까지는 보고되지 않아 보다 안전하다는 장점이 있다[21]. 특히, 박테리아로부터 생산한 항균성 펩타이드의 일종인 나이신은 이미 식품 보존제로 미국 식품의약국으로부터 승인을 받아 사용되고 있다. 뿐만 아니라 다수의 제약회사들이 현재 항균성 펩타이드를 치료에 사용하기 위해 개발하고 있으며, 일부는 임상시험 중에 있다[22].

본 실험에 사용한 KR12(KRIVKRIKKWLR)는 인간유래 카텔리시딘 펩타이드(human cathelicidin peptide, LL37)의 가장

짧은 항균성 모티프로[23-25], LL37은 인체의 다양한 상피 세포나 면역세포에서 분비된다[26]. LL37은 인체 내에서 항균성뿐만 아니라 내독소를 중화시키고[27], 염증 반응을 조절하며[28], 상피 세포의 이동·증식·분화를 통한 재생피화[29-33] 및 신생혈관 재생[34-36]을 통해 상처 치유를 촉진하는 등 다양한 생체활성을 갖는다. 하지만 LL37이 상처 치유에 있어서 이렇게 다양한 기능성을 가짐에도 불구하고, 잠재적인 세포 독성이 존재한다는 점과, 생체 내에서 다양한 효소에 의해 가수분해 될 수 있다는 점 때문에 그 사용이 제한되고 있다[37-40]. 이로 인하여 항균성 펩타이드의 세포 독성을 낮추고 안정성을 향상시키고자, 항균성 펩타이드를 재료 표면에 고정화하는 연구가 진행되어 왔다. 의료용 소재 분야에서는 도뇨관[41-43], 치과 및 정형외과용 임플란트[44-46], 인공 각막[47] 등에 항균성 펩타이드를 고정화한 연구가 보고되었다. 하지만 항균성 펩타이드가 상처 치유에 있어 다양한 기능성을 가짐에서 불구하고, 항균성 펩타이드를 창상피복재에 적용한 사례는 극히 드물며[48-50], 항균성 펩타이드를 재료 표면에 고정화하였을 때 다양한 기능성이 유지되는지에 관한 연구는 아직까지 진행되지 않았다.

본 연구에서는 항균성 펩타이드(Cys-KR12)를 화학적 반응을 통해 전기방사한 실크피브로인 나노섬유 지지체에 고정화하고, 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 표면 특성에 대하여 분석하였다. 그리고 항균성 펩타이드의 고정화 밀도를 달리하여, 병원성 박테리아에 대한 항균성을 평가하였다. 또한 표면에 고정화된 항균성 펩타이드가 각질세포 및 섬유아세포의 증식, 각질세포의 분화, 대식세포에 의한 염증성

시토카인의 발현에 미치는 영향에 대해 평가함으로써, 항균성 펩타이드가 고정화된 실크피브로인 나노섬유 지지체의 다양한 생체활성 부여에 따른 창상피복재로서의 응용가능성을 고찰하였다.

제 2 장 문헌연구

2.1. 실크피브로인

2.1.1. 생체재료로서의 실크피브로인

실크 단백질은 인시목(*Lepidoptera*)이나 거미강(*Arachnida*)과 같은 절지동물이 분비하는 섬유형태의 단백질로, 종에 따라 아미노산 조성이나 물리적 성질 등이 매우 다양하다. 그 중 가잠(*Bombyx mori*)의 누에고치로부터 얻는 실크 단백질은 두 가닥의 실크피브로인 섬유를 실크세리신이 감싸고 있는 구조로, 기계적 강도가 매우 우수하여 오래 전부터 섬유산업에 이용되어 왔다. 실크피브로인은 390kDa의 H사슬과 25kDa의 L사슬이 이황화 결합으로 연결되어 있는 구조로, 실크세리신이 체내에서 면역반응을 일으키는데 반해, 실크피브로인은 면역반응을 일으키지 않고, 생체적합성이 매우 우수하다고 알려져 있다[6].

실크피브로인은 생체적합성이 우수하다는 점 때문에 최근 생체재료로서 많은 연구가 진행되어 왔다. 주로 골재생[51-54], 연골재생[55, 56], 인공고막[57, 58], 인공혈관[59-61] 등 조직공학용 지지체로 이용하고자 하는 시도가 많았으며, 특히 창상피복재로서 우수한 생체적합성을 나타내었다[62-64]. You et al.[65]은 키틴과 실크피브로인을 혼합하여 전기방사한 나노섬유가 키틴으로만 구성된 나노섬유에 비하여 각질세포의 부착 및 확산이 잘 된다고 보고하였으며, Roh et al.[66]은 실크피브로인과 알긴산을 혼합한 스폰지가 상업적으로 판매되는 거즈 형태의 창상피복재에 비하여 상처 치유를 촉진한다고 보고하였다. 또한 Gil

et al.[8]은 실크피브로인을 필름, 층상 구조의 다공성 필름, 전기방사한 나노섬유 세 가지 형태로 제조하고, 상업적으로 판매되는 하이드로콜로이드 형태의 창상피복재와 상처 치유 효과를 비교하였다. 그 결과 전기방사한 나노섬유가 가장 높은 상처 치유 효과를 보이는 것을 확인함으로써, 전기방사한 실크피브로인 나노섬유가 창상피복재로서 우수한 성능을 지님을 확인하였다.

2.1.2. 항균성을 부여한 실크피브로인 지지체

실크피브로인은 그 자체로는 미생물에 대한 항균성이 없기 때문에, 많은 연구진들이 실크피브로인에 항균성을 부여하기 위한 연구를 진행하였는데, 주로 항균성을 갖는 물질을 물리적으로 흡착 또는 혼재시키거나, 화학적으로 고정화하여 실크피브로인에 항균성을 부여하였다.

항균성 물질로는 항생제의 일종인 테트라사이클린[67, 68]과 젠타마이신[69]을 이용하여 실크피브로인에 항균성을 부여한 연구사례가 있었으며, 천연추출물인 카테킨[70], 감귤추출물[71], 커큐민[72, 73], 알로에 베라[74] 등을 이용하여 실크피브로인에 항균성을 부여한 연구사례도 있었다. 최근에는 금속 나노입자인 은 나노입자[75-79]를 이용하여 항균성을 부여하려는 연구가 주를 이루었으며, 티타늄 옥사이드 나노입자[80]를 이용하여 항균성을 부여한 연구사례도 존재했다. 또한 항균성 고분자로 알려진 키토산[81-83]이나 폴리에틸렌이민[84]을 이용하여 항균성을 부여한 사례도 있었으며, 항균성 펩타이드[85-87]를 이용하여 항균성을 부여한 사례도 존재했다.

2.2. 항균성 펩타이드

2.2.1. 항균성 펩타이드의 특징 및 기작

항균성 펩타이드는 인간을 비롯하여 포유류, 식물, 곤충, 어류, 양서류, 박테리아 등 다양한 생물체 내에 존재하는 물질로, 일반적으로 10-50개의 아미노산으로 구성된 작은 크기의 분자이다. 포유류의 경우, 대다수의 항균성 펩타이드가 상피세포나 백혈구에서 만들어지는데, 이는 항균성 펩타이드가 외부로부터 침입한 박테리아나 곰팡이, 바이러스 등으로부터 생체를 보호하는 1차적인 역할을 하기 때문이다[19, 20].

항균성 펩타이드는 기원에 따라 다양한 구조를 갖고 있다. 인간에 존재하는 LL37이나 누에나방에 존재하는 세크로핀, 개구리에 존재하는 마가이닌 같은 경우에는 알파나선 구조를 가지고 있으며, 디펜신 계열의 경우에는 이황화 결합으로 연결된 베타시트 구조를 가지고 있다. 또한 인간에 존재하는 히스타틴이나 소에 존재하는 인돌리시딘의 경우에는 알파나선 구조나 베타시트 구조가 아닌 선형구조를 가지고 있다. 항균성 펩타이드는 같은 종에서조차 서로 다른 구조를 갖지만, 공통적으로 친수성 도메인과 소수성 도메인 모두를 갖는 양친매성 구조에 양전하를 띠는 특징을 지닌다[19, 20].

항균성 펩타이드가 박테리아에 대해 항균성을 나타내는 기작은 앞서 언급한 공통적인 구조적 특징에서 기인한다. 박테리아의 세포막은 산성의 인지질로 구성되어 있어 음전하를 띠기 때문에, 양전하를 띠는 항균성 펩타이드와 정전기적 인력에 의해 가까워지게 되고, 이후 소수성 도메인과 박테리아 세포막의 인지질

부분이 소수성 상호작용에 의하여 결합하게 된다. 세포막과 결합한 항균성 펩타이드의 양이 많아지면, 인지질이 이동하면서 세포막 구조가 바뀌게 되고, 결국 세포막에 구멍이 뚫리거나 세포막이 파괴되게 된다. 세포막이 파괴되면 세포 내부의 칼륨 이온이 바깥으로 빠져 나오기 때문에 박테리아가 죽게 되는 것이다. 반면 진핵세포의 경우 세포막이 양쪽성의 인지질로 구성되어 있고, 콜레스테롤 분자가 세포막에 존재하기 때문에 상대적으로 정전기적 인력이 낮다. 또한 일반적으로 항균성 펩타이드의 소수성은 그리 높지 않기 때문에, 진핵세포의 양쪽성 인지질과는 잘 결합하지 못한다. 따라서 진핵세포에는 독성을 나타내지 않고, 박테리아에 대해서 선택적인 독성을 나타내게 되는 것이다[88, 89].

2.2.2. 항균성 펩타이드의 다양한 기능성

항균성 펩타이드는 항균성뿐만 아니라 생체 내에서 다양한 기능을 수행한다. 특히 인체에 존재하는 여러 항균성 펩타이드 중 유일한 카텔리시딘 계열의 펩타이드인 LL37의 경우 다른 항균성 펩타이드에 비해 매우 다양한 기능을 수행한다. Rosenfeld et al.[27]과 Mookherjee et al.[28]에 따르면 LL37은 그람 음성균의 세포벽 구성물질인 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 중화시키거나 지질다당류의 수용체와 경쟁적으로 결합함으로써, 지질다당류에 의한 대식세포의 염증성 시토카인의 분비를 억제한다고 한다. LL37의 또 다른 기능 중 하나는 상처 치유를 촉진시키는 것이다. LL37은 상피 세포의 이동 및 증식, 분화를 촉진[29-33]시키고 신생혈관 재생을 촉진하는 것으로 알려져 있다[34-36]. Cherreddy et al.[90]은 LL37을

폴리(락티드-글리콜리드) 공중합체 나노입자에 담지하여 쥐의 상처 부위에 투여한 결과, 콜라겐 합성 및 재생피화, 신생혈관 재생이 촉진되었음을 확인하였고, 이를 통해 LL37이 상처 치유에 있어 다양한 기능을 가진다는 것을 확인하였다.

2.2.3. 항균성 펩타이드의 고정화 방법

항균성 펩타이드를 재료 표면에 화학적으로 고정화하는 방법은 그 재료의 표면 특성에 따라 다양하게 달라진다. 주로 항균성 펩타이드의 N-말단이나 결사슬에 존재하는 아민기를 이용하여 재료 표면에 고정화를 하였다. 카르복실기를 갖는 표면의 경우는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS)를 이용하여 아민기와 반응시켜 고정화하였고[85, 91], 에폭시기를 갖는 표면의 경우 아민기에 의한 친핵성 개환반응에 의해 고정화를 하였다[41]. 또한 아민기를 갖는 표면의 경우 글루타르알데히드를 링커로 이용하여 항균성 펩타이드의 아민기와 반응시켜 고정화였다[92]. 하지만 이렇게 항균성 펩타이드의 아민기를 이용하여 고정화할 경우, N-말단과 결사슬의 아민기 모두 반응에 참여할 수 있기 때문에 특이적인 방향으로 고정화할 수 없다는 문제점이 있다.

이에 따라 항균성 펩타이드의 말단에 티올기를 갖는 시스테인을 도입하여 특이적인 방향으로 고정화하는 방법이 제안되었다. 티올기의 경우 말레이미드기의 이중결합에 특이적으로 반응하기 때문에 이를 이용한 방법이 주를 이루었고[93, 94], 티올기를 갖는 표면과 이황화 결합을 통해 고정화한 사례도 있었다[95]. 또한 아크릴기를 갖는 하이드로젤의 경우에는 빛에 의해 하이드로젤

제조와 고정화 반응을 동시에 진행하기도 하였으며[96, 97], 표면을 폴리도파민으로 코팅한 경우에는 티올기와 아민기 모두를 이용하여 고정화하는 것도 가능하였다[43]. 최근에는 항균성 펩타이드 말단에 아자이드기를 도입하여 알킨기를 갖는 표면에 보다 특이적으로 고정화하기도 하였다[46].

제 3 장 재료 및 방법

3.1. 재료

실험에 사용한 재생 실크피브로인은 가잠(*Bombyx mori*) 누에고치로부터 얻었다. 먼저, 건조된 가잠 누에고치를 100℃의 0.3% (w/v) 올레산나트륨과 0.2% (w/v) 탄산나트륨 수용액에서 1시간 동안 정련하여 세리신을 제거하였다. 정련된 누에고치는 증류수로 수세한 뒤 건조하였다. 이후 정련된 누에고치를 1:5의 옥비로 60℃의 9.3 M 브롬화리튬 수용액에서 4시간 동안 용해한 뒤 증류수로 3일간 투석하여 실크피브로인 수용액을 얻었고, 이를 다시 동결 건조하여 스펀지 형태의 재생 실크피브로인을 얻었다.

실험에 사용한 Cys-KR12(CKRIVKRIKKWLR, >95% purity) (Figure 1)는 (주)BeadTech로부터 구입하였으며, 별도로 명시하지 않은 시약은 모두 Sigma Aldrich에서 구입하였다.

3.2. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 제조

3.2.1. 전기방사

전기방사를 위하여 재생 실크피브로인을 포름산에 11% (w/v)로 4시간 동안 용해하여 방사원액을 제조하였다. 이후 방사원액을 주사기에 옮겨 담아 13 kV의 전압, 0.3 mL/h의 유속으로 24시간 동안 황산지 위에 전기방사하였다. 전기방사한 실크피브로인 나노섬유 지지체는 에탄올에 1시간 동안 침지하여 결정화하였다.

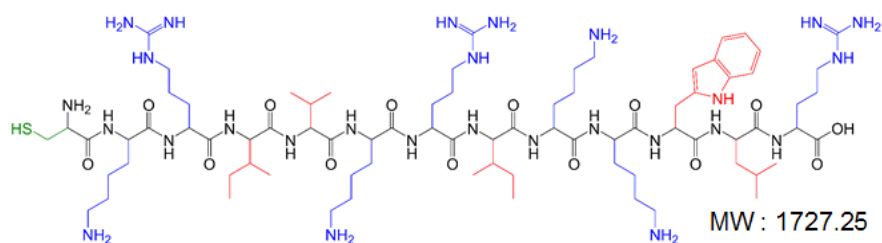


Figure 1. Chemical structure of Cys-KR12. Peptide sequence is $\text{NH}_2\text{-CKRIVKRIKKWLR-COOH}$. (blue: basic residue, red: hydrophobic residue, green: thiol group of cysteine residue)

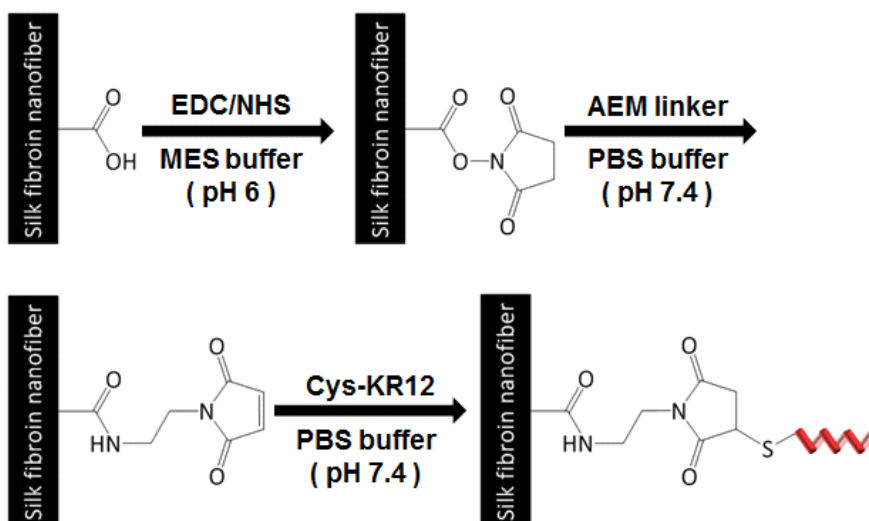
3.2.2. 항균성 펩타이드의 고정화

Cys-KR12를 고정화하기 위한 반응은 EDC/NHS와 티올-말레이미드 반응을 이용하여 3단계로 진행하였다(Figure 2). 먼저, 실크피브로인 나노섬유 지지체를 충분히 수화시키기 위하여 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES) 완충용액(pH 6.0)에 1시간 동안 침지시켰다. 그리고 EDC(0.4 mg/mL)와 NHS(0.6 mg/mL)를 넣고 15분간 반응시켜 카르복실기를 활성화시켰다. 이후 말레이미드기를 도입하기 위하여 pH 7.4의 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에서 N-(2-aminoethyl)maleimide(AEM) 링커(0.2 mg/mL)와 2시간 동안 반응시키고, 반응 후 증류수로 세 번 수세하였다. 마지막으로, AEM 링커가 도입된 실크피브로인 나노섬유 지지체(SF-AEM)를 다양한 농도(50, 100, 200, 500 μ g/mL)의 Cys-KR12 용액에 넣고 pH 7.4의 PBS 완충용액에서 4시간 동안 반응시켜 Cys-KR12를 고정화하였다. 반응이 끝난 후, 미반응물을 제거하기 위하여 증류수로 세 번 수세하였다. 시료명은 고정화에 사용한 Cys-KR12 용액의 농도로 명명하였으며, Table 1에 표기하였다.

3.3. 표면 특성 분석

3.3.1. 형태학적 구조

제조한 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면의 형태학적 구조를 살펴보기 위하여 전계방출형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)(SUPRA, Carl Zeiss, Germany)을 이용하였다. 주사전자현미경 사진 중 섬유 100개를




HS- : Cys-KR12 ($\text{H}_2\text{N-CKRIVKRIKKWLR-COOH}$)

Figure 2. Reaction scheme for immobilization of Cys-KR12 on SF nanofiber matrix using EDC/NHS and thiol-maleimide chemistry.

Table 1. Sample identification with concentrations of Cys–KR12 solution.

Sample ID	Pristine SF	K50	K100	K200	K500
Concentration of Cys–KR12 (μ g/mL)	–	50	100	200	500

임의 선정된 후, Image J 소프트웨어를 이용하여 나노섬유의 평균 직경 및 분포를 측정하였다.

3.3.2. 항균성 펩타이드의 정량

표면에 고정화 된 Cys-KR12의 양은 Ellman' s assay를 이용하여 정량화하였다. 먼저, 고정화 반응 전 용액과 고정화 반응 후 남아 있는 용액 20 μ L를 각각 96-well pate에 옮긴 후, Ellman 시약(5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid), DTNB) (Thermo Scientific, USA) 200 μ L를 넣고 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후 412 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더기(Microplate reader) (Synergy HT, Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. 반응 수율(1) 및 고정화 밀도(2)는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$Y = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

$$d = \frac{(C_i - C_f) \times V}{A} \quad (2)$$

where, Y : reaction yield

d : immobilization density

C_i : initial concentration of the peptide solution

C_f : final concentration of the peptide solution

V : volume of the peptide solution

A : surface area of the nanofiber matrix

나노섬유의 표면적은 나노섬유를 원기둥 모양으로 가정하고 식 (3)과 (4)를 이용하여 계산하였다.

$$V = \frac{m_{air}}{\rho_f} = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 L \quad (3)$$

$$A = \pi DL = \frac{4m_{air}}{\rho_f D} \quad (4)$$

where, D : mean diameter of the nanofiber

L : length of the nanofiber

m_{air} : mass of the nanofiber matrix in air

ρ_f : density of the nanofiber

나노섬유의 밀도는 공기 중에서의 질량과 헥산 속에서의 질량을 측정하여 이를 다음 식(4)에 대입하여 계산하였다.

$$\rho_f = \frac{m_{air} - m_h}{m_h} \times \rho_h \quad (5)$$

where, m_h : mass of the nanofiber matrix in n-hexane

ρ_h : density of hexane at measured temperature

3.3.3. 제타 전위 측정

항균성 펩타이드의 고정화에 따른 표면 전하의 변화를 확인하기 위하여 전기영동 광산란 광도계(Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer, ELS) (ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan)로 나노섬유 지지체 표면의 제타 전위를 측정하였다. 측정은 pH 7.0의 증류수에 침지하여 나노섬유 지지체를 수화시킨 후 25℃에서 측정하였다.

3.3.4. 표면 원소 분석

항균성 펩타이드 고정화에 따른 표면의 원소 변화를 확인하기

위하여 X선 광전자 분광법(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) (SIGMA PROBE, Thermo Scientific, USA)을 실시하였다. X선원은 Al K_{α} ($h\nu=1486.6$ eV) 단색광을 사용하였으며, 0.0–1000.0 eV 범위를 1.0 eV 간격으로 survey scan 하였다. 고해상도의 XPS 스펙트럼은 C1s의 전자결합에너지인 285.0 eV를 기준으로 하여, C1s(278.0–298.0 eV), N1s(392.0–412.0 eV), O1s(524.0–544.0 eV)를 0.1 eV 간격으로 분석하였다.

3.4. 항균성 평가

3.4.1. 박테리아 배양

항균성 평가 실험에는 2종의 그람 양성균과 2종의 그람 음성균을 사용하였다. 그람 양성균으로는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)과 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228)을 사용하였으며, 그람 음성균으로는 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 9637)과 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15692)을 사용하였다. 박테리아는 Luria–Bertani(LB) (BD Difco) 배지와 한천 평판 위에서 37℃ 조건으로 배양하였다. 접종균액의 농도는 600 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더기로 측정하여 조절하였다.

3.4.2. 최소저지농도

본 실험에 사용한 Cys–KR12의 용액 상태에서의 항균성을 확인하기 위하여, 배지미량희석법(broth microdilution method)을 이용하여 4종의 박테리아에 대하여 최소저지농도(minimum

inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 이를 위하여 Cys-KR12를 PBS 완충용액에 1-40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹여 Cys-KR12 용액을 제조하였다. 이후 96-well polypropylene plate에 Cys-KR12 용액 50 μL 와 접종균액(1×10^6 CFU/mL) 50 μL 를 넣고 37°C에서 20시간 동안 진동 배양하였다. 박테리아의 성장을 확인하기 위해 1시간 간격으로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 최소저지농도는 박테리아의 성장을 저지하는 Cys-KR12 용액의 최소 농도로 정의하였다.

3.4.3. 지지체의 항균성 평가

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성은 JIS Z 2801 방법을 이용하여 4종의 박테리아에 대해 평가하였다. 먼저, 50 μL 의 접종균액(1×10^5 CFU/mL)을 제조한 시료에 접종한 후 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 시료를 24-well plate에 옮겨 1 mL의 PBS 완충용액에 침지시킨 후 5분간 초음파 수조(KODO JAC-4020, 40 kHz)에서 초음파 처리를 하여, 지지체에 붙어 있던 박테리아를 용액 속으로 다시 분산시켰다. 초음파 처리를 하여 분산시킨 박테리아 현탁액을 10배로 단계희석한 후, 50 μL 의 박테리아 현탁액을 다시 LB 한천 평판에 도말하고, 이를 37°C에서 24시간 동안 배양하여 형성된 균락의 수를 측정하였다.

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성이 장시간 안정적으로 유지되는지를 확인하기 위하여 PBS 완충용액에 침지한 후, 3주 동안 37°C와 4°C에서 보관하였다. 1주일 간격으로 보관하고 있던 시료를 꺼내어 전과 동일한

방법으로 황색포도상구균과 대장균에 대하여 항균성을 평가하였다. 정균감소율(bacterial reduction)은 형성된 군락의 수를 측정하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$R = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (6)$$

where, R : bacterial reduction

M_1 : colony forming unit of Pristine SF

M_2 : colony forming unit of K200

3.4.4. 지지체의 바이오필름 형성 유무 평가

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 바이오필름 형성 유무는 FE-SEM으로 확인하였다. 이를 위해 먼저 50 μ L의 접종균액(1×10^6 CFU/mL)을 시료에 접종한 후 37℃에서 24시간 동안 무진동 배양하였다. 이후 시료를 PBS 완충용액으로 세 번 수세한 뒤, 2.5%(v/v) 글루타르알데히드 용액으로 박테리아 세포를 고정화하였고, 다시 고정화된 시료를 FE-SEM 관찰을 위하여 에탄올 수용액으로 탈수하였다.

3.5. 세포적합성 평가

3.5.1. 세포 배양

세포적합성 평가에는 인간유래 각질세포(human keratinocyte, HaCaT), 인간유래 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast, NHDF), 쥐유래 대식세포(murine macrophage, Raw 264.7) 이렇게 3종의 동물세포를 사용하였다. 세포 배양에는 10%(v/v)의

소태아혈청과 1% (v/v)의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 돌베코수정이글배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Corning)를 사용하였으며, 37℃에서 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3.5.2. 세포 독성 평가

본 실험에 사용한 Cys-KR12의 용액 상태에서의 세포 독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 각질세포와 섬유아세포를 각각 96-well plate에 10,000 cells/well의 농도로 접종한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 이후 무혈청배지에 Cys-KR12를 1-1,000 µg/mL의 농도로 녹인 뒤, 세포 배지를 Cys-KR12 용액으로 바꿔주고 24시간 동안 더 배양하였다. 24시간 배양 후, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 용액 (5 mg/mL) 10 µL를 세포 배지에 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 형성된 불용성의 포르마잔 결정을 다시 150 µL의 디메틸설폭시드에 30분간 용해한 뒤, 570 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더기를 통해 측정하였다. 상대적 세포 생존율은 아무 처리를 하지 않은 대조군을 기준으로 계산하였으며, 반수치사량 (lethal dose 50, LD50)은 Origin 소프트웨어를 통해 DoseResp sigmoidal curve fitting을 하여 계산하였다.

3.5.3. 세포 증식능 평가

Cys-KR12가 고정화된 실크피브로인 나노섬유 지지체의 세포 증식능을 평가하기 위하여 각질세포와 섬유아세포의 대사활성 및

DNA 양을 측정하였다. 먼저, 96-well plate에 세 가지 시료(Pristine SF, K200, K500)를 올려놓고, 그 위에 각각의 세포를 2,000 cells/well로 접종하여 10일간 배양하였다.

세포의 대사활성은 CellTiter-Blue[®] cell viability assay를 이용하여 측정하였다. 1, 4, 7, 10일차에 10배 농도의 CellTiter-Blue[®] 시약(Promega) 20 μ L를 200 μ L의 배지에 희석하여 각 well에 넣어준 뒤 5시간 동안 반응시켰다. 이후 세포 배지 150 μ L를 black 96-well plate로 옮긴 뒤, 마이크로 플레이트 리더기로 형광강도(Ex: 560 nm, Em: 590 nm)를 측정하였다.

세포의 DNA 양은 QuantiFluor[®] dsDNA assay를 이용하여 측정하였다. 1, 10일차에 세포를 배양한 지지체를 PBS 완충용액으로 세 번 수세한 후, 1.5 mL 마이크로튜브로 옮겨 담아 TIANamp Genomic DNA kit(Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출 및 정제하였다. 이후 정제된 DNA 시료 100 μ L와 QuantiFluor[®] dsDNA 시약(Promega) 100 μ L를 black 96-well plate에 옮겨 5분간 상온에서 반응시킨 뒤, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 형광강도(Ex: 504 nm, Em: 531 nm)를 측정하였다.

세포의 대사활성 및 DNA 양은 1일차 값에 대한 변화량(fold change)으로 계산하여 표기하였다.

3.5.4. 웨스턴 블로팅(western blotting)

각질세포의 분화 정도를 평가하기 위하여 각질세포의 분화 표지인 인볼루크린(involutrin)을 웨스턴 블로팅하였다. 이를 위해 먼저, 시료(Pristine SF, K200, K500)를 48-well plate에 올려놓고, 그

위에 각질세포를 20,000 cells/well의 농도로 접종하여 10일간 배양하였다. 대조군으로는 시료를 올려놓지 않은 tissue culture plate(TCP)를 사용하였다. 배양된 세포로부터 단백질을 추출하기 위하여, 시료를 세 번 수세한 후 RIPA 완충용액(Amresco)으로 세포를 용해하고, 이를 Amicon® Ultra Centrifugal Filter(Merck Millipore)(MWCO 3,000)를 이용하여 농축하였다.

농축된 단백질 추출액의 농도를 BCA assay kit(Thermo Scientific)를 이용하여 측정한 뒤, 같은 농도로 희석하여 SDS-폴리아크릴 아마이드 젤 전기영동(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)을 실시하였다. 젤은 10% 폴리아크릴 아마이드 젤(Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad)을 사용하였다.

전기영동으로 분리한 단백질을 Trans-Blot® Turbo™ Transfer System(Bio-Rad)을 이용하여 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 막(Bio-Rad)에 옮긴 후, 5%(w/v) 탈지유를 첨가한 PBST(PBS with 0.05% Tween 20) 용액을 처리하여 단백질의 비특이적결합을 차단하였다. 탈지유 처리한 PVDF 막에 1, 2차 항체를 각각 1시간씩 처리하고, 각 처리가 끝날 때마다 30분간 PBST로 세 번씩 수세하였다. 이후 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP) 기질(West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific)을 5분간 처리하고, 이를 CCD 카메라(ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad)로 촬영하여 단백질 밴드 이미지를 얻었다. 1차 항체로는 대조군 단백질인 베타액틴(β -actin) 항체(mouse anti-human beta actin loading control antibody(BA3R), Thermo Scientific)와 분화 표지

단백질인 인볼루크린 항체(mouse anti-human involucrin antibody(SY5), Thermo Scientific)를 사용하였으며, 2차 항체로는 겨자무과산화효소가 포함된 항체(HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Thermo Scientific)를 사용하였다. 1, 2차 항체 희석액은 SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit(Merck Millipore)를 사용하였다.

밴드의 강도는 Image J 소프트웨어를 사용하여 측정하였으며, 베타액틴 대비 인볼루크린 강도(involucrin/ β -actin)를 계산하여 나타내었다.

3.5.5. 면역형광법(immunofluorescence)

각질세포의 분화 정도를 형광현미경으로 관찰하기 위하여 면역형광법을 이용하였다. 앞선 실험과 동일한 조건으로 각질세포를 10일간 배양한 시료를 PBS 완충용액으로 세 번 수세한 후 4%(w/v) 파라포름알데히드 수용액에 10분간 침지시켜 세포를 고정화하였다. 고정화된 세포에 0.25%(v/v)의 Triton X-100과 1%(w/v)의 BSA를 처리한 후, 1차 인볼루크린 항체와 형광표지된 2차 항체(Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Thermo Scientific)를 차례대로 1시간씩 처리하였다. 이후 F-액틴(F-actin)과 세포핵을 염색하기 위하여 각각 로다민-팔로이딘(rhodamine-phalloidin) (Molecular Probe)과 다피(DAPI) (Molecular Probe)로 염색하였다. 염색된 세포의 관찰은 공초점레이저현미경(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) (TCS SP8, Leica)으로 실시하였다.

3.5.6. 효소결합면역흡착측정법

지질다당류에 의한 종양괴사인자알파(TNF- α)의 발현을 효소결합면역흡착측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 측정하였다. 먼저, 시료(Pristine SF, K200, K500)를 96-well plate에 올려놓고, 그 위에 대식세포를 50,000 cells/well의 농도로 접종한 뒤 12시간 동안 배양하였다. 이후 대장균(O111:B4)에서 추출한 지질다당류를 10 ng/mL로 6시간 동안 처리하여 대식세포의 면역반응을 활성화시키고, 이를 ELISA kit(Novex)를 이용하여 측정하였다. 지질다당류를 처리하기 전과 후의 세포 배지 50 μ L를 바이오틴이 결합된 항체(Ms TNF- α Biotin Conjugate) 50 μ L와 함께 포획 항체가 코팅된 96-well plate에 넣어주고 상온에서 90분간 반응시켰다. 이후 streptavidin-HRP 용액 100 μ L를 넣고 30분간 반응시켜준 뒤, TMB(tetramethylbenzidine) 발색체(chromogen) 100 μ L를 넣고 30분간 반응시켰다. 마지막으로 반응을 멈추기 위해 정지액(stop solution) 100 μ L를 넣어준 뒤, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

3.6. 통계처리

정량화된 모든 실험은 세 번씩 반복 실험하였으며, 결과 값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. Pristine SF와 명시한 시료 간의 통계적 유의성은 스튜던트 t-검정을 사용하여 확인하였다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 표면 특성

4.1.1. 형태학적 구조

전기방사를 통해 제조한 나노섬유 지지체는 세포의 기질이 갖는 나노 크기의 섬유상 및 다공성 구조를 재현하여, 세포가 부착하고 증식하는 데 좋은 환경을 제공해주기 때문에, 항균성 펩타이드의 고정화 후에도 이러한 나노섬유 구조를 유지하는 것이 매우 중요하다. **Figure 3**은 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 항균성 펩타이드를 고정화하기 전과 후의 주사전자현미경 사진이다. **Figure 3A**를 통해 본 실험에서 사용한 전기방사 조건 하에서 비드(bead)없이 가느다란 나노섬유가 잘 방사되었다는 것을 확인할 수 있었고, **Figure 3B**를 통해 Cys-KR12를 고정화한 후에도 이러한 나노섬유 구조가 유지된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 **Figure 3C**와 **3D**를 통해 확인할 수 있듯이, Cys-KR12를 고정화한 후의 실크피브로인 나노섬유 지지체의 평균 섬유 직경은 356 ± 55 nm로, 고정화 전의 평균 섬유 직경인 354 ± 66 nm와 차이가 없었으며, 섬유 직경 분포 역시 200–600 nm 범위에서 비슷한 분포를 갖는 것을 확인하였다.

따라서 본 실험에서 사용한 EDC/NHS 반응과 티올-말레이미드 반응이 나노섬유 지지체의 형태학적 구조에 영향을 끼치지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 언급하였듯이 나노섬유 지지체를 생체재료로 활용함에 있어서 매우 중요한 요소이기에, 본 실험에

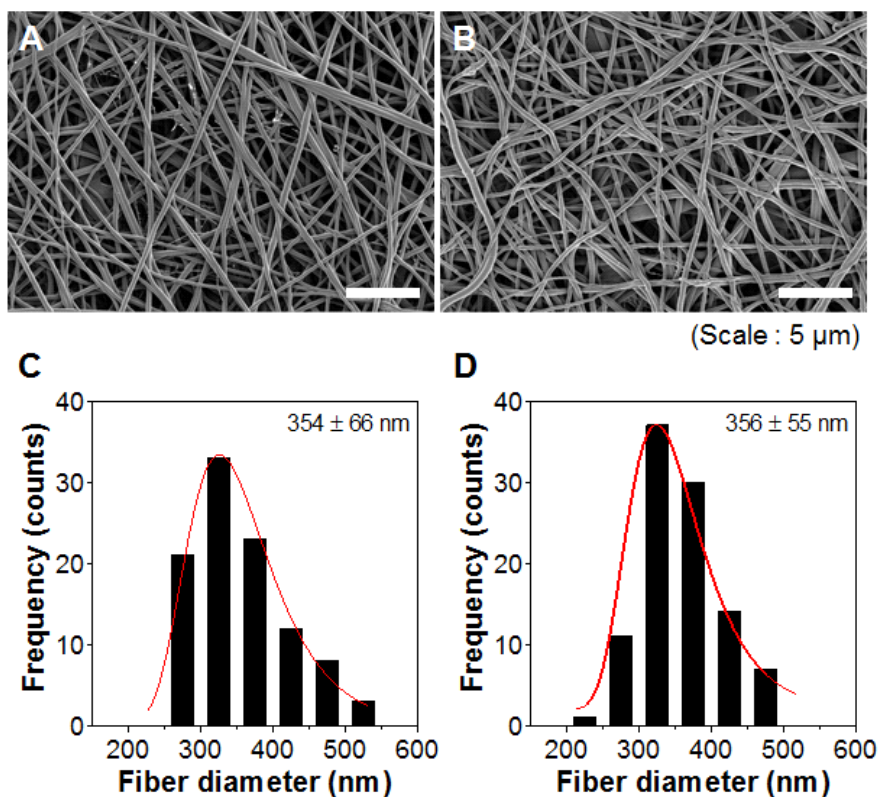


Figure 3. FE-SEM images of SF nanofiber matrix (A) before and (B) after peptide immobilization; Average fiber diameter and fiber diameter distribution of SF nanofiber matrix (C) before and (D) after peptide immobilization.

사용한 EDC/NHS 반응과 티올-말레이미드 반응이 나노섬유 지지체의 화학적 개질 반응에 적합한 반응이라는 사실을 알 수 있다.

4.1.2. 고정화 항균성 펩타이드의 정량적 분석

항균성 펩타이드를 표면에 고정화하는 경우 펩타이드의 고정화 밀도와 고정화 방향, 스페이서(spacer)의 길이나 유연성 등에 의해 활성이 크게 달라진다[98]. 본 연구에서는 Cys-KR12 용액의 농도를 달리함으로써 표면에 고정화된 Cys-KR12의 고정화 밀도를 조절하였다. **Figure 4**는 Cys-KR12 용액의 농도에 따른 고정화 밀도와 반응 수율을 나타낸 그래프이다. Cys-KR12 용액의 농도를 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 500 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가시킴에 따라 Cys-KR12의 고정화 밀도는 0.15 nmol/cm^2 에서 1.43 nmol/cm^2 로 거의 비례하게 증가하였다. 고정화 반응의 수율 역시 Cys-KR12의 농도를 증가시킴에 따라 95.9%에서 91.0%로 다소 감소하기는 하였으나, 모든 조건에서 90% 이상의 높은 수치를 나타냈다.

이처럼 매우 높은 반응 수율은 두 가지 요소에 기인한 것으로 생각된다. 첫 번째는 나노섬유가 가지는 형태학적 구조에 기인한다. 전기방사로 제조한 나노섬유는 다른 제조형태에 비하여 매우 큰 비표면적과 다공성 구조를 갖는다. Lee et al.[99]은 전기방사로 제조한 실크피브로인 나노섬유에 글루타르알데히드를 이용하여 알파키모트립신을 고정화한 결과, 정련한 실크피브로인 섬유나 세리신을 함유한 실크피브로인 섬유에 비하여 5배 정도 높은 고정화 효율을 보였다. Ye et al.[100] 역시 전기방사한

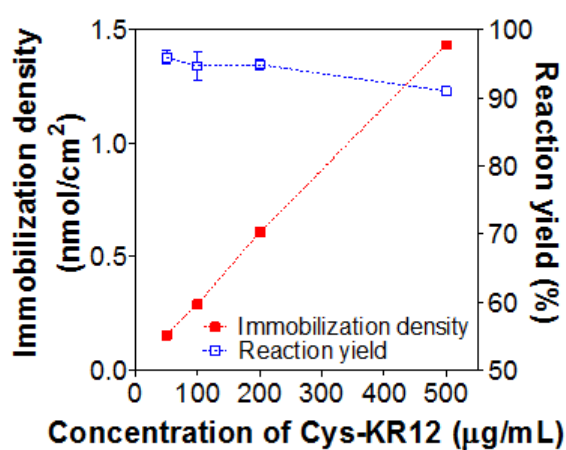


Figure 4. Immobilization density of Cys-KR12 and reaction yield with various concentrations of Cys-KR12 measured by Ellman' s assay.

폴리(아크릴로니트릴-말레산) 공중합체 나노섬유에 리파아제를 고정화한 결과, 중공사에 비하여 10배 정도 높은 고정화 효율을 보였다.

두 번째는 티올-말레이미드 반응의 높은 반응성에 기인한다. 티올-말레이미드 반응은 마이클 첨가반응의 한 형태로, 친핵체가 알파베타 불포화 카보닐 화합물의 베타 위치에 첨가되는 친핵성 첨가반응이다. 특히, 티올기는 친핵체 중에서도 전지밀도가 높은 반면, 말레이미드의 C=C 결합은 결합각 왜곡과 고리 변형 및 시스 형태의 카보닐기로 인하여 다른 마이클 공여기보다 반응성이 매우 높다[101].

따라서 전기방사로 제조한 나노섬유의 형태학적 구조와 더불어 티올-말레이미드 반응의 높은 반응성으로 인하여, Cys-KR12가 높은 수율로 고정화되었다고 생각된다.

4.1.3. 고정화 항균성 펩타이드의 정성적 분석

Figure 5는 Cys-KR12를 고정화하였을 때 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면의 제타 전위 변화를 나타낸 그래프이다. 아무런 처리를 하지 않은 Pristine SF는 표면이 음전하를 띠는데, 이는 실크피브로인의 등전점이 약 pH 4.5 부근이기 때문이다. 단백질의 등전점은 분자 내 양전하를 띠는 작용기와 음전하를 띠는 작용기의 전하량 합이 같아, 전체적으로 중성을 띠게 되는 pH를 말한다. 등전점보다 pH가 높게 되면 산성 작용기가 염기성 작용기보다 많이 이온화되어 전체적으로 음전하를 띠게 된다. 반대로 등전점보다 pH가 낮게 되면 염기성 작용기가 산성 작용기보다 많이 이온화되어 전체적으로 양전하를 띠게 된다.

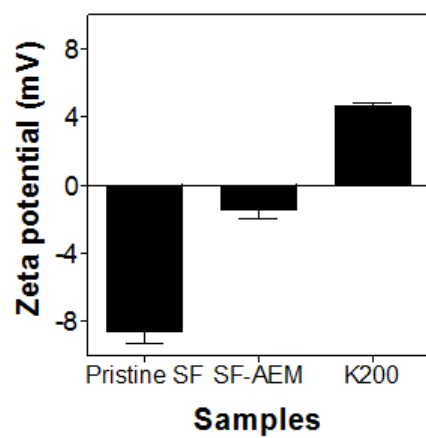


Figure 5. Surface zeta potential of Pristine SF, SF–AEM, and K200 measured by ELS at pH 7.0.

따라서 등전점보다 높은 pH 7.0에서 Pristine SF가 음전하를 띠는 것이다. SF-AEM의 경우에는 표면이 음전하를 띠고 있긴 하지만, Pristine SF에 비하여 표면의 음전하 값이 감소하였다. 이는 산성 작용기인 카르복실기가 AEM 링커의 아민기와 반응하여 아마이드 결합을 형성함에 따라, 이온화될 수 있는 카르복실기의 수가 줄어들었기 때문이다. 반면, K200의 경우 표면전하가 음전하에서 양전하로 바뀌었는데, 이는 양전하를 띠는 양이온성의 Cys-KR12가 고정화되었기 때문이다. Cys-KR12의 순전하량(net charge)은 +7로, **Figure 1**에서 볼 수 있듯이 아미노산 서열 13개 중 산성 아미노산은 존재하지 않으며 C-말단의 카르복실기가 유일한 산성 작용기이다. 반면 N-말단을 제외한 염기성 아미노산은 아미노산 서열 13개 중 총 7개로, 아민기를 갖는 리신이 4개, 구아니딘기를 갖는 아르기닌이 3개 존재한다. 따라서 Cys-KR12의 고정화에 따른 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면의 제타 전위 변화는 양전하를 띠는 Cys-KR12의 고정화에 기인한다. Lequeux et al.[91] 역시 히알루론산에 항균성 펩타이드인 나이신을 고정화하고 용액 상태에서의 제타 전위를 측정한 결과, 고정화된 양이 증가할수록 음전하 값이 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 제타 전위 변화를 통해 Cys-KR12가 성공적으로 고정화되었음을 확인하였다.

이러한 변화는 XPS를 이용한 표면의 원소 분석 결과에서도 동일하게 나타난다. **Figure 6A**와 **6B**는 각각 Pristine SF와 K200의 survey scan 스펙트럼으로, 단백질을 구성하는 원소인 탄소(C1s), 질소(N1s), 산소(O1s)가 모두 존재하는 것이 확인되었다. **Figure 6C**부터 **6H**는 각각의 원소에 대한 고해상도

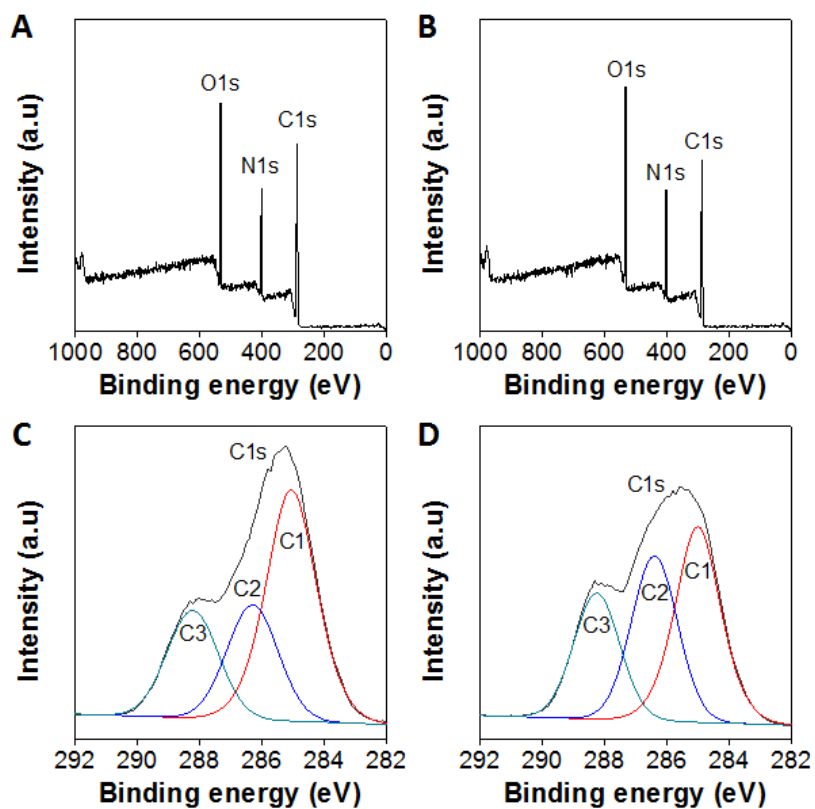


Figure 6. XPS analysis for characterization of surface elemental composition. Survey scan spectra of (A) Pristine SF and (B) K200; High resolution C1s spectra of (C) Pristine SF and (D) K200; High resolution N1s spectra of (E) Pristine SF and (F) K200; High resolution O1s spectra of (G) Pristine SF and (H) K200.

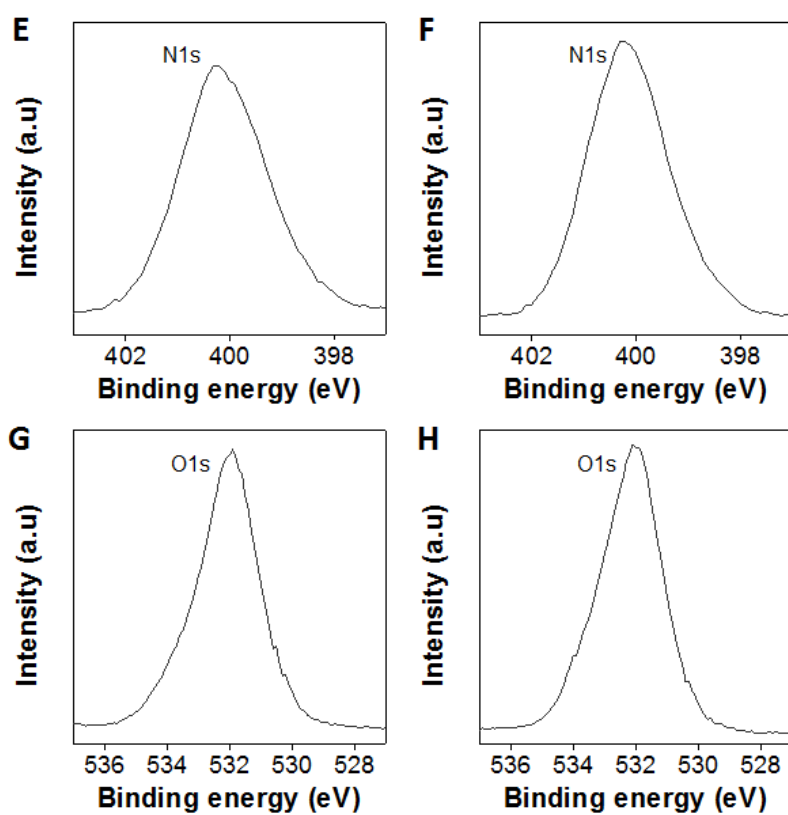


Figure 6. (continued)

XPS 스펙트럼이다. **Figure 6E**와 **6F**, **6G**와 **6H**에서 볼 수 있듯이, 질소와 산소의 고해상도 XPS 스펙트럼에서는 큰 차이를 발견하지 못했다. 하지만 Cys-KR12를 고정화하기 전(**Figure 6C**)과 후(**Figure 6D**)의 탄소의 고해상도 XPS 스펙트럼에서는 차이가 존재했다. C1s의 피크는 크게 지방족 탄소인 C-C나 C-H에 해당하는 C1(285.0 eV), C-N이나 C-O 결합에 해당하는 C2(286.5 eV), 펩타이드의 주사슬인 O=C-N 결합에 해당하는 C3(288.5 eV)로 분리된다. **Table 2**는 C1s의 각 피크별 원자백분율(atomic percent, at%)을 나타낸 것인데, Cys-KR12를 고정화하였을 때 펩타이드의 주사슬인 O=C-N 함량에는 큰 변화가 없으나, 지방족 탄소에 해당하는 C-C나 C-H의 함량은 줄고 C-N이나 C-O의 함량은 증가하였다. 또한 N1s와 C1s의 상대적 원자백분율 비(N/C ratio) 역시 Cys-KR12의 고정화 이후에 0.22에서 0.24로 증가하였다. 이는 상대적으로 질소 함량이 높은 Cys-KR12의 고정화 때문이다. 앞서 언급하였듯이 Cys-KR12는 아민기와 구아니딘기를 갖는 리신과 아르기닌을 다수 포함하고 있는 반면, 실크피브로인은 리신(0.2mol%)과 아르기닌(0.3mol%) 함량이 매우 낮고, 결정 구조 역시 주로 GAGAGS나 GAGAGY로 이루어져 있다. 따라서 Cys-KR12가 실크피브로인에 비하여 상대적으로 질소 함량이 높기 때문에, 고정화 이후에 C1s 피크에서 C-N 결합에 해당하는 피크의 원자백분율이 높아지고 N/C ratio가 증가한 것이다. 이러한 결과는 Cys-KR12의 고정화 이후에 표면 전하가 음전하에서 양전하로 바뀐 것과 상응한다. Bai et al.[85] 역시 실크피브로인 필름에 항균성 펩타이드인 세크로핀을 고정화한 후 XPS로 분석한 결과, N/C ratio가 0.24에서 0.26으로

Table 2. Surface elemental composition of Pristine SF and K200.

Sample	Pristine SF	K200
C1(at%) (C–C, C–H)	51.26	40.75
C2(at%) (C–N, C–O)	25.14	33.61
C3(at%) (O=C–N)	23.60	25.64
C1s(at%)	81.79	80.63
N1s(at%)	18.21	19.37
N/C ratio	0.22	0.24

증가하였다. 따라서 XPS 분석을 통해 Cys-KR12가 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 성공적으로 고정화되었음을 다시 한 번 확인하였다.

4.2. 고정화 항균성 펩타이드의 항균성

4.2.1. 항균성 펩타이드의 최소저지농도

항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성을 평가하기에 앞서, KR12의 N-말단에 시스테인을 도입한 Cys-KR12가 항균성을 유지하는지 확인하였다. 일반적으로 어떤 물질이 박테리아에 대해 항균성을 갖는지는 최소저지농도를 측정하여 확인한다. 현탁액은 구성 입자의 수가 증가할수록 빛이 산란되기 때문에 투과도가 낮아지는데, 박테리아 현탁액 역시 박테리아의 수가 증가할수록 600 nm 파장에서의 투과도가 낮아진다. 따라서 600 nm 파장에서의 흡광도가 증가하지 않는 것은 박테리아가 성장하지 않는 것을 의미하며, 이러한 최소 농도를 최소저지농도라 한다.

Figure 7은 4종의 병원성 박테리아에 대한 최소저지농도 측정 결과이다. 대장균의 경우 Cys-KR12의 농도가 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 때 더 이상 박테리아가 성장하지 않았으며, 이를 제외한 나머지 세 가지 균주는 8 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 때 박테리아 수가 증가하지 않았다. KR12의 최소저지농도는 1-8 μM 로 알려져 있다[24]. 따라서 최소저지농도 측정 결과를 통해 N-말단에 시스테인을 도입한 Cys-KR12가 항균성을 유지함을 확인하였다.

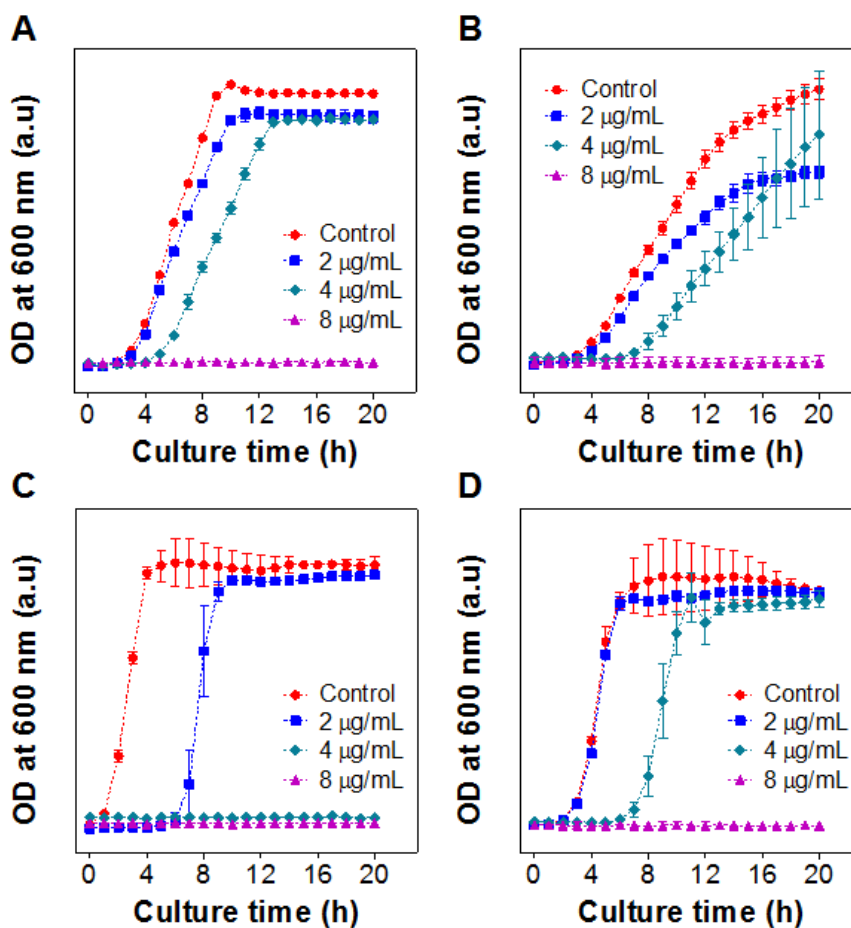


Figure 7. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of Cys-KR12 against (A) *S. aureus*, (B) *S. epidermidis*, (C) *E. coli*, and (D) *P. aeruginosa* measured by broth microdilution method. OD at 600 nm was kinetically measured for monitoring bacterial growth. MIC was 4 µg/mL for *E. coli* and 8 µg/mL for the others.

4.2.2. 고정화 밀도에 따른 항균성

Figure 8은 Cys-KR12의 고정화 밀도에 따른 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성을 평가한 결과다. K50과 K100의 경우 Pristine SF에 비하여 살아있는 박테리아의 수가 적긴 하였지만 여전히 생존하고 있는 박테리아가 존재하였으며, 일부 균주에 대해서는 초기 접종한 개체 수보다 증가하기도 하여 실질적으로 항균성을 갖는다고 볼 수 없었다. 반면 보다 많은 양의 항균성 펩타이드가 고정화된 K200과 K500의 경우 모든 박테리아가 사멸하였다. 따라서 K200의 고정화 밀도인 0.60 nmol/cm^2 가 높은 항균성을 나타내는 최소 고정화 밀도임을 확인하였다.

앞서 언급하였듯이 표면에 고정화된 항균성 펩타이드의 활성은 고정화 밀도와 고정화 방향, 스페이서의 길이나 유연성 등에 의해 달라진다. Bagheri et al.[102]은 표면에 항균성 펩타이드를 고정화할 경우 활성이 감소하기 때문에 활성을 유지하기 위해서는 길이가 긴 스페이서가 필요하다고 주장하였고, Gabriel et al.[103] 역시 항균성 펩타이드를 고정화할 경우 입체 장애가 존재하기 때문에 충분한 길이의 유연한 스페이서가 있어야 항균성 펩타이드가 활성을 잃지 않는다고 주장하였다. 하지만 본 연구에서 사용한 AEM 링커는 그 길이가 탄소 5개 길이 정도밖에 되지 않는 매우 짧은 스페이서임에도 불구하고 높은 항균성을 갖는 지지체를 제조할 수 있었다. 실제로 최근에는 스페이서를 사용하지 않거나 짧은 길이의 스페이서를 사용하고도 높은 항균성을 나타낸다는 연구결과가 보고되었다[43, 96, 104].

이렇게 짧은 스페이서를 사용했음에도 불구하고 높은 항균성을 가진 이유는 두 가지 요소에 기인한다고 생각된다. 먼저, 항균성

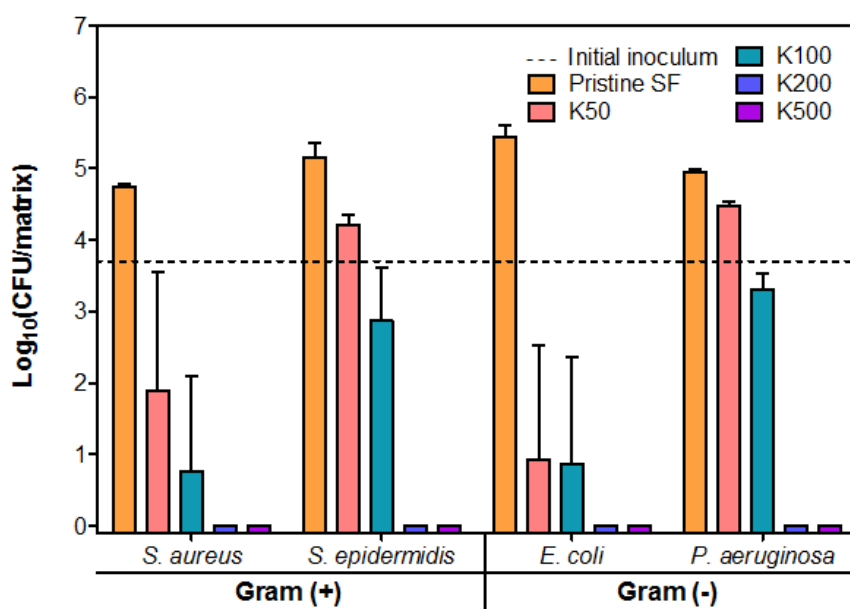


Figure 8. Surface antimicrobial activity of Pristine SF and Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix measured by modified JIS Z 2801 method.

펩타이드의 특이적인 고정화 방향이 높은 항균성을 나타냈다고 생각된다. 항균성 펩타이드의 양이온성 잔기와 소수성 잔기는 박테리아의 세포막에 침투하는데 중추적인 역할을 담당하기 때문에, 양이온성 잔기는 표면 쪽으로, 소수성 잔기는 바깥쪽으로 향하게 고정화하는 것이 중요하다[105]. 본 실험에 사용한 KR12는 소수성 잔기인 트립토판이 C-말단에 위치하고 있기 때문에(Figure 1), KR12의 N-말단에 티올기를 갖는 시스테인을 도입하여 소수성 잔기를 바깥으로 노출시킬 수 있도록 고정화하였다. 따라서 항균성 펩타이드가 박테리아의 세포막에 보다 더 효과적으로 작용할 수 있도록 N-말단 방향으로 특이적으로 고정화 한 것이 높은 항균성을 나타낸 원인이라 생각된다.

두 번째 요인은 나노섬유 구조와 티올-말레이미드 반응에 의한 높은 고정화 밀도 때문이라 생각된다. 기존 문헌들과 비교해보면 반응 용액의 펩타이드 농도는 거의 유사하나 고정화 밀도는 본 연구에서 대략 10배 정도 높았다. 이처럼 높은 고정화 밀도는 음전하를 띠는 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면을 양전하를 띠게끔 변화시켰으며, 양전하를 띠는 표면이 음전하를 띠는 박테리아 세포막을 정전기적 인력으로 강하게 끌어당김으로써 표면에 고정화되어 있는 Cys-KR12가 박테리아 세포막을 효과적으로 파괴시킬 수 있도록 해주었다[3]. 따라서 항균성 펩타이드의 고정화 밀도를 충분히 증가시킴으로써, 표면에 고정화된 항균성 펩타이드가 효과적으로 박테리아의 세포막을 파괴시켜 높은 항균성을 나타냈다고 생각된다.

4.2.3. 보관 온도에 따른 항균성

항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체를 창상피복재로 사용하기 위해서는, 장기 보관에 따른 항균성의 유지도 중요한 요소이다. 따라서 본 연구에서는 높은 항균성을 보였던 K200에 대해 보관 온도에 따른 항균성을 평가하였다. **Figure 9A**와 **9B**를 통해 확인할 수 있듯이, 4℃에서 보관할 경우에는 3주 이상 보관하더라도 항균성이 떨어지지 않고 유지되는 반면, 37℃에서 보관할 경우에는 대장균에 대한 항균성은 유지되지만 1주일 이후부터 황색포도상구균에 대한 항균성이 떨어지는 것을 확인하였다. 이처럼 보관 온도에 따라 항균성이 떨어지는 원인은 고정화한 항균성 펩타이드가 변성되기 때문이라고 생각된다. 일반적으로 단백질이나 펩타이드는 수용액 상태에서 장기간 보관 시 그 구조가 변하기 때문에, 냉장 또는 냉동 상태로 보관하거나 동결건조하여 보관한다. 따라서 본 연구에서 사용한 Cys-KR12를 고정화하여 창상피복재로 사용할 시, 4℃에서 냉장 보관하여 사용하거나 건조된 형태로 보관하여 사용한다면 항균성을 유지할 수 있을 것이라 생각된다.

4.2.4. 항바이오필름 효과

박테리아가 고체 표면에 부착하게 되면 바이오필름을 형성하게 되는데, 한번 바이오필름이 형성되면 항생제나 면역체계에 의해 쉽게 제거되지 않고 주변 영양소를 뺏아갈 뿐만 아니라 내독소를 분비한다. 따라서 빠른 상처 치유를 위해서는 창상피복재 표면에 바이오필름이 형성되지 않게 하는 것이 중요하다. **Figure 10**은 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 Cys-KR12를 고정화하기

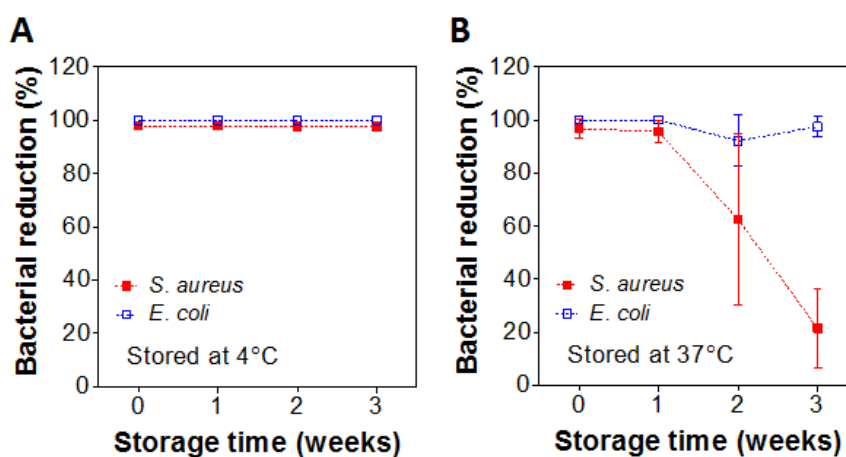


Figure 9. Long-term stability of Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix at (A) 4°C and (B) 37°C storage. Bacterial reduction (%) was calculated based on CFU of Pristine SF.

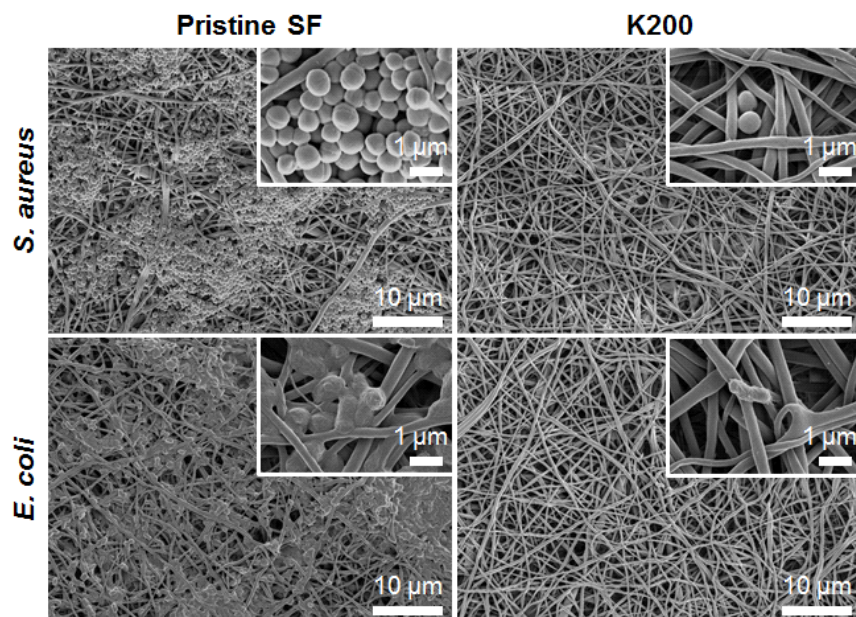


Figure 10. FE-SEM images of 24 h-cultured *S. aureus* and *E. coli* on Pristine SF (left column) and K200 (right column) to observe biofilm formation.

전과 후의 주사전자현미경 사진이다. Cys-KR12를 고정화하지 않은 Pristine SF의 경우 황색포도상구균과 대장균이 바이오필름을 형성하여 나노섬유 지지체 표면을 완전히 덮은 반면, Cys-KR12를 고정화한 K200의 경우 나노섬유 지지체 표면에 부착된 박테리아의 수가 현저히 줄어들었으며, 바이오필름 역시 형성되지 않았다. 따라서 표면에 고정화한 이후에도 Cys-KR12가 바이오필름 형성을 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

4.3. 고정화 항균성 펩타이드가 세포 거동에 미치는 영향

4.3.1. 항균성 펩타이드의 잠재적 세포 독성

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체가 세포 거동에 미치는 영향을 확인하기 전에, 본 연구에 사용한 Cys-KR12가 가지는 세포 독성을 확인하였다. **Figure 11**에서 확인할 수 있듯이, 각질세포와 섬유아세포 모두 Cys-KR12 용액의 농도가 50 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 낮을 때는 대조군인 TCP와 비교하여 세포 생존율이 유사하거나, 오히려 각질세포의 경우에는 더 높게 나타났다. 반면, Cys-KR12 용액의 농도가 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 높을 때는, 용액의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 낮아져, 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 때는 거의 생존하지 못하였다. 세포 생존율이 50%가 되는 반수치사량은 각질세포의 경우 239.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 섬유아세포의 경우에는 148.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 이는 Cys-KR12의 최소저지농도(4-8 $\mu\text{g/mL}$)에 비하여 약 20~35배 정도 높은 수치이다. 따라서 높은 농도에서는

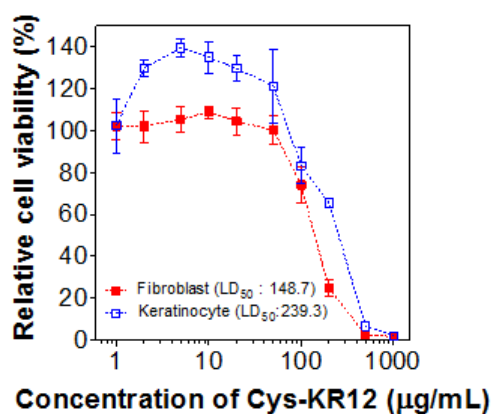


Figure 11. Cytotoxicity of Cys-KR12 on human keratinocyte (HaCaT) and human dermal fibroblast (NHDF) cells measured by MTT assay. Relative cell viability was calculated based on non-treated control. LD50 was calculated by DoseResp sigmoidal curve fitting using Origin software.

Cys-KR12가 세포 독성을 나타내지만, 항균성을 나타내는 농도 범위에서는 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

4.3.2. 각질세포 및 섬유아세포 증식에 미치는 영향

피부 상처의 회복은 표피층의 각질세포와 진피층의 섬유아세포의 증식 및 분화를 통해 이루어진다. 따라서 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체를 창상피복재로 이용하기 위해, 고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 평가하였다. **Figure 12**는 높은 항균성을 보였던 K200과 K500, 그리고 대조군인 Pristine SF에 각질세포(**Figure 12A**)와 섬유아세포(**Figure 12B**)를 10일 동안 배양하였을 때 세포의 대사활성 변화를 측정한 결과이다. 각질세포의 경우 K200과 K500 모두 Pristine SF와 비교하여 1일차보다 세포의 대사활성이 크게 증가하였으며, 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 변화폭이 더 크게 나타났다. 섬유아세포 역시 각질세포와 비슷하게 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 세포의 대사활성 증가폭이 커지는 경향성이 나타났다.

이러한 경향성은 DNA 양을 측정한 결과에서도 동일하게 나타났다. **Figure 13**은 Pristine SF, K200, K500에 각질세포(**Figure 13A**)와 섬유아세포(**Figure 13B**)를 10일 동안 배양하였을 때 DNA 양의 변화를 측정한 결과이다. 표면에 고정화한 Cys-KR12의 양이 증가할수록 각질세포와 섬유아세포 모두 1일차보다 DNA의 양이 크게 증가하였다. 일반적으로 세포의 수가 증가하면 대사활성의 총합과 DNA의 총량이 증가하게 된다. 따라서 대사활성의 증가와 DNA 양의 증가를 통하여, 표면에

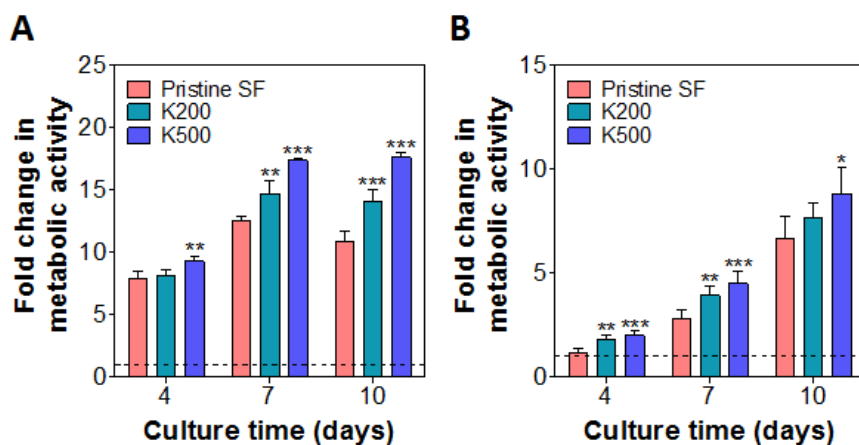


Figure 12. Fold changes in metabolic activity of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: metabolic activity on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF on each day.

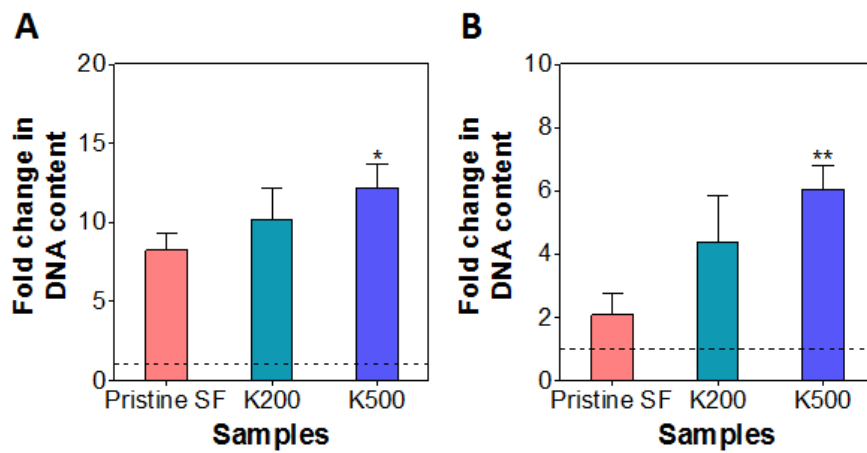


Figure 13. Fold changes in DNA content of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: DNA content on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF on day 10.

고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식을 촉진시킨다는 것을 확인하였다.

4.3.3. 각질세포 분화에 미치는 영향

표피는 4개의 층으로 구성되는데 안쪽부터 바깥쪽 순으로 기저층(basal layer), 가시층(spinous layer), 과립층(granular layer), 각질층(cornified layer)으로 이루어져있다. 상처가 생기게 되면 안쪽의 기저층이 점차 가시층, 과립층, 각질층으로 분화하게 된다[106]. 따라서 본 연구에서는 과립층의 분화 표지 단백질인 인볼루크린 발현을 통해, 고정화된 Cys-KR12가 각질세포의 분화에 미치는 영향을 평가하였다.

Figure 14는 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체(K200, K500)와 Pristine SF, 그리고 대조군인 TCP 위에 각질세포를 10일간 배양하였을 때, 각질세포에서 발현된 인볼루크린을 웨스턴 블로팅한 결과이다. 대조군 단백질인 베타액틴 대비 인볼루크린이 발현된 양을 비교하였을 때, 실크피브로인 나노섬유 지지체 위에서 배양한 경우 전반적으로 대조군인 TCP보다 인볼루크린이 많이 발현되었으며, 표면에 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 Pristine SF보다 인볼루크린이 상대적으로 많이 발현되었다(**Figure 14B**).

이러한 경향성은 면역형광법을 이용하여 인볼루크린을 염색한 사진에서도 동일하게 나타난다. **Figure 15**에서 볼 수 있듯이, TCP보다는 실크피브로인 나노섬유 지지체를 사용한 경우에 인볼루크린을 나타내는 녹색의 형광강도가 높았으며, 표면에 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 녹색의 형광강도가

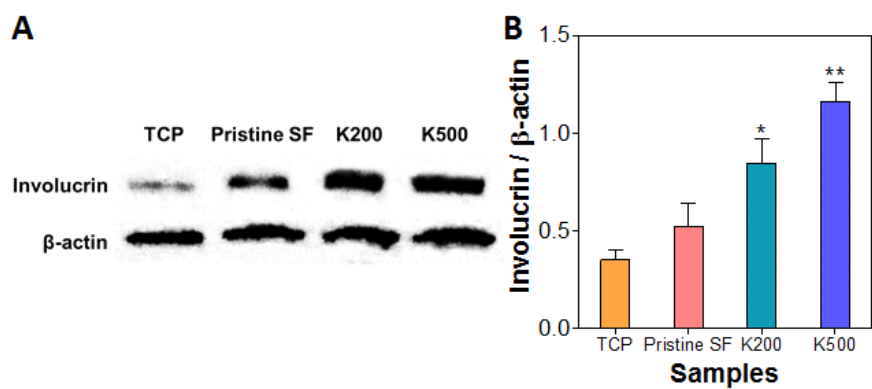


Figure 14. (A) Western blot analysis and (B) normalized amount of expressed involucrin by human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF.

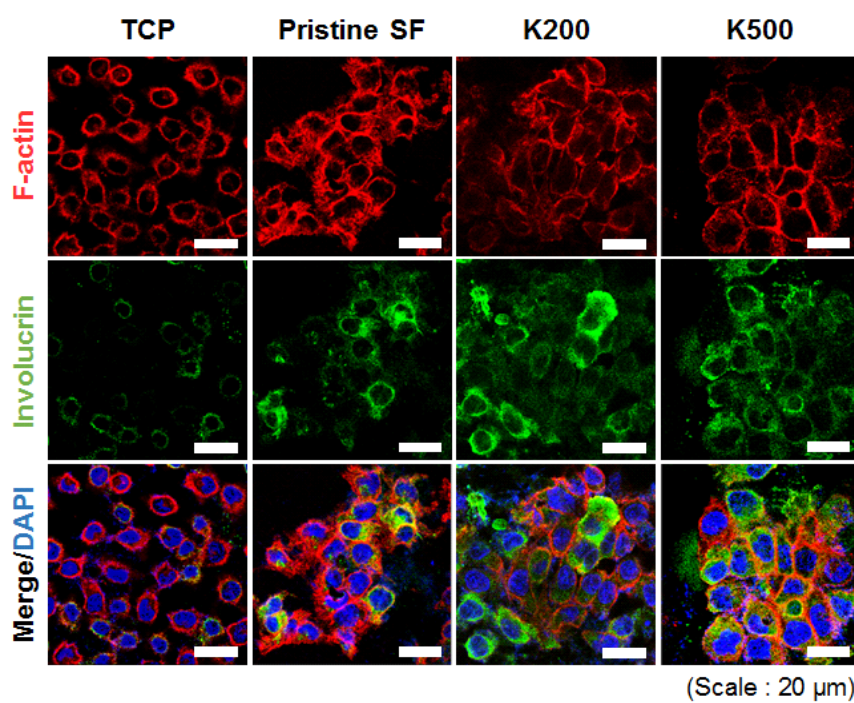


Figure 15. Immunofluorescence images of human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. (red: F-actin, green: involucrin, blue: nuclei)

높았다. 또한 F-액틴을 나타내는 빨간색의 형광사진에서 볼 수 있듯이, 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 세포들이 보다 밀접하게 연결되어있으며, 둥근 모양이 아닌 각질화된 형태의 모양을 띠는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 웨스턴 블로팅과 면역형광법 결과를 통해서 표면에 고정화된 Cys-KR12가 각질세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 확인하였다.

LL37은 미토겐 활성화 단백질 인산화효소(mitogen-activated protein kinase, MAPK)군에 속하는 세포외 신호조절 인산화효소(extracellular signal-regulated kinase, ERK)와 p38 인산화효소를 활성화시키고[29, 32], 이를 통해 세포의 이동 및 증식, 분화 등을 조절한다고 알려져 있다[107-109]. 하지만 LL37의 항균성 모티프인 KR12의 세포 증식 및 분화에 관한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 실험에서 표면에 고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진시키는 기작은 명확하게 알 수가 없으나, 아마도 LL37과 유사한 방식으로 세포 활성을 조절할 것이라 짐작해볼 수 있다.

4.3.4. 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향

상처 치유 과정에 있어서 또 다른 중요한 부분 중 하나가 바로 염증 반응이다. 염증 반응은 다양한 인자들에 의해서 일어나는데, 상처 부위에서 일어나는 염증 반응 중 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 지질다당류에 의한 염증 반응이 가장 중요하다. 지질다당류는 박테리아가 죽더라도 혈관을 타고 몸속으로 퍼져 패혈증을 유발하여 몸 전체에서 염증반응일 일으킬 뿐만 아니라

심한 경우에는 사망에 이르게 한다. 또한 지질다당류에 의해 발현되는 염증성 시토카인의 한 종류인 종양괴사인자알파는 기질금속단백질분해효소(matrix metalloproteinase)의 합성을 촉진하고 콜라겐의 축적을 저해하여, 결과적으로 상처 치유를 지연시킨다[2]. 따라서 본 연구에서는 지질다당류에 의한 대식세포의 종양괴사인자알파 발현을 통해, 고정화된 Cys-KR12가 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향을 평가하였다.

Figure 16은 실크피브로인 나노섬유 지지체 위에서 배양한 대식세포에, 지질다당류에 의한 자극을 주었을 때 발현된 종양괴사인자알파의 농도를 효소면역흡착측정법으로 측정한 결과이다. 지질다당류에 의한 자극을 주기 전에는 모든 시료에서 종양괴사인자알파의 농도가 50 pg/mL 이하로 매우 낮게 측정되었다. 하지만, 지질다당류에 의한 자극을 주자 음성대조군인 TCP와 Cys-KR12를 고정화 하지 않은 Pristine SF의 경우 550-720 pg/mL까지 종양괴사인자알파의 농도가 급격하게 증가하였다. 반면, 양성대조군인 용액상태의 Cys-KR12와 실험군인 K200, K500에서는 종양괴사인자알파의 농도가 증가하긴 하였지만, 80-200 pg/mL 수준으로 낮은 수준을 유지하였다. 특히 표면에 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 발현된 종양괴사인자알파의 농도가 낮았다.

LL37이 지질다당류에 의한 종양괴사인자알파의 발현을 억제하는 기작은 대식세포의 지질다당류 수용체인 CD14 수용체에 지질다당류가 결합되는 것을 방해함으로써 이루어진다. 지질다당류는 일반적으로 지질다당류결합단백질을 매개로 CD14 수용체에 결합한 뒤, 톨-유사 수용체4(Toll-like receptor 4,

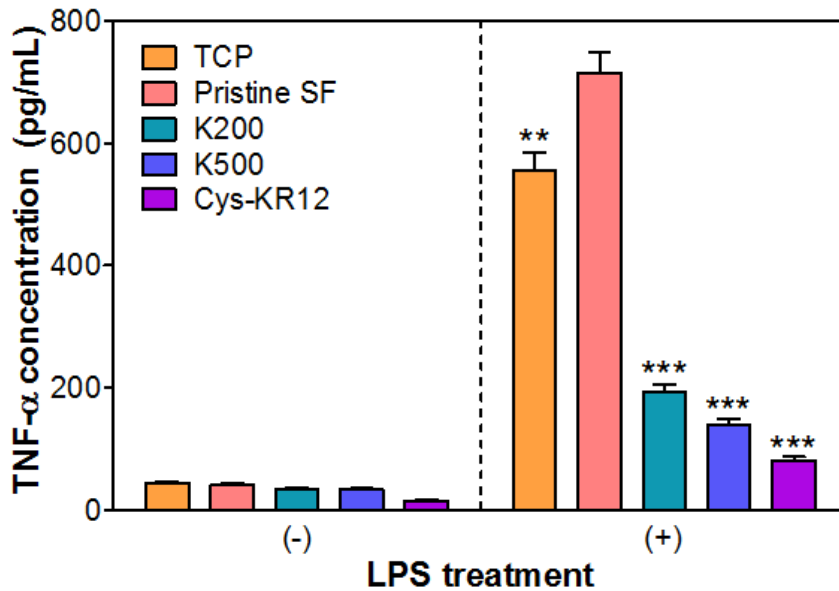


Figure 16. Expression of $\text{TNF-}\alpha$ by mouse macrophage cells (Raw 264.7) stimulated by LPS (10 ng/mL) for 6 h. Cells were cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500 samples prior to LPS stimulation. TCP and Cys-KR12 peptide (20 $\mu\text{g/mL}$) were used as negative and positive control for each. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF after LPS stimulation.

TLR4)와 복합체를 형성하여 엔에프-카파비(Nuclear Factor- κ B, NF- κ B)를 활성화시킴으로써 종양괴사인자알파를 발현시킨다. LL37은 지질다당류와 결합하여 지질다당류를 중화시키거나, 지질다당류결합단백질과 결합하여 CD14와 결합하는 것을 방해하기도 하며, CD14 수용체에 직접 결합하여 지질다당류의 결합을 경쟁적으로 저해함으로써 종양괴사인자알파의 발현을 억제한다[27, 28]. Jacob et al.[24]의 연구 결과에 따르면, 본 실험에서 사용한 KR12 유도체(KR-12-a3)의 경우 지질다당류에 대한 결합력은 낮지만 효과적으로 종양괴사인자알파의 발현을 억제하기 때문에, LL37과 유사한 기작으로 CD14 수용체에 경쟁적으로 결합하여 종양괴사인자알파의 발현을 억제한다고 한다. 따라서 표면에 고정화된 Cys-KR12 역시 대식세포의 CD14 수용체에 경쟁적으로 결합하여 지질다당류가 결합하는 것을 방해함으로써 종양괴사인자알파의 발현을 억제하는 것으로 생각된다.

제 5 장 결 론

본 연구에서는 상처 치유에 있어 다양한 역할을 하는 인간유래 카텔리시딘 펩타이드(LL37)를 창상피복재에 이용하고자, LL37의 항균성 모티프인 Cys-KR12를 전기방사를 통해 제조한 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 고정화하였다. 그리고 이에 따른 표면 특성을 분석하고, 고정화된 Cys-KR12가 항균성 및 세포 거동에 미치는 영향에 대해서 확인하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항균성 펩타이드를 EDC/NHS와 티올-말레이미드 반응을 이용해서 고정화한 결과, 모든 조건에서 90% 이상의 높은 반응 수율을 나타냈으며, 주사전자현미경 사진을 통해 고정화 반응이 나노섬유의 형태학적 구조에 영향을 끼치지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 양이온성의 Cys-KR12를 고정화함에 따라 나노섬유 지지체 표면의 전하가 음전하에서 양전하로 바뀌었으며, 표면의 원소 분석 결과 C-N 결합과 N/C ratio가 증가하였다. 이를 통해 Cys-KR12가 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 성공적으로 고정화되었음을 확인하였다.
2. 고정화 밀도를 조절하여 그에 따른 항균성을 평가한 결과, 고정화 밀도가 0.60 nmol/cm^2 이상인 K200과 K500에서 병원성 박테리아에 대해 높은 항균성을 나타내었다. 또한 주사전자현미경 사진을 통해 표면에 고정화된 Cys-KR12가 항균성뿐만 아니라 항바이오필름 효과를 나타냄을 확인하였다.

3. 피부를 구성하는 각질세포와 섬유아세포의 세포활성과 DNA 양을 측정한 결과, 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 세포활성과 DNA 양이 1일차보다 크게 증가하였다. 또한 각질세포의 분화 표지 단백질인 인볼루크린의 발현 정도를 측정한 결과, 역시 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 더 많은 양의 인볼루크린이 발현되었다. 이를 통해 표면에 고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 확인하였다.
4. 그람 음성균의 세포벽 구성물질인 지질다당류에 의한 종양괴사인자알파의 발현 정도를 측정한 결과, 표면에 Cys-KR12를 고정화한 경우 종양괴사인자알파가 거의 발현되지 않았다. 이를 통해 표면에 고정화된 Cys-KR12가 지질다당류에 의한 대식세포의 염증성 시토카인 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.
5. 위의 결과들을 토대로 볼 때, 표면에 고정화된 Cys-KR12는 항균성 및 항바이오필름 효과뿐만 아니라, 피부를 구성하는 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진시키는 효과를 가지며, 지질다당류에 의한 염증성 시토카인의 발현을 억제하는 효과를 갖는다. 이러한 효과는 Cys-KR12의 모태가 된 LL37이 본래 인체에서 가지는 다기능성에 기인하며, 표면에 고정화 한 이후에도 이처럼 다양한 기능성이 유지된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체를 창상피복재로 응용할 수 있으리라 기대된다.

참고문헌

- [1] C. K. Sen, G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner and M. T. Longaker, Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy, *Wound Repair Regen*, **17**, 763–771 (2009).
- [2] R. Edwards and K. G. Harding, Bacteria and wound healing, *Current Opinion in Infectious Diseases*, **17**, 91–96 (2004).
- [3] F. Siedenbiedel and J. C. Tiller, Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles, *Polymers*, **4**, 46–71 (2012).
- [4] G. D. Mogosanu and A. M. Grumezescu, Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, *Int J Pharm*, **463**, 127–136 (2014).
- [5] M. Abrigo, S. L. McArthur and P. Kingshott, Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects, *Macromolecular Bioscience*, **14**, 772–792 (2014).
- [6] C. Vepari and D. L. Kaplan, Silk as a Biomaterial, *Progress in polymer science*, **32**, 991–1007 (2007).
- [7] A. R. Murphy and D. L. Kaplan, Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin, *J Mater Chem*, **19**, 6443–6450 (2009).

- [8] E. S. Gil, B. Panilaitis, E. Bellas and D. L. Kaplan, Functionalized silk biomaterials for wound healing, *Adv Healthc Mater*, **2**, 206–217 (2013).
- [9] Z. G. Wang, L. S. Wan, Z. M. Liu, X. J. Huang and Z. K. Xu, Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview, *J Mol Catal B-Enzym*, **56**, 189–195 (2009).
- [10] J. Kaur, R. Rajkhowa, T. Afrin, T. Tsuzuki and X. Wang, Facts and myths of antibacterial properties of silk, *Biopolymers*, **101**, 237–245 (2014).
- [11] H. Nikaido, Multidrug resistance in bacteria, *Annu Rev Biochem*, **78**, 119–146 (2009).
- [12] T. Thorsteinsson, M. Masson, K. G. Kristinsson, M. A. Hjalmarisdottir, H. Hilmarsson and T. Loftsson, Soft antimicrobial agents: synthesis and activity of labile environmentally friendly long chain quaternary ammonium compounds, *J Med Chem*, **46**, 4173–4181 (2003).
- [13] B. S. Atiyeh, M. Costagliola, S. N. Hayek and S. A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature, *Burns*, **33**, 139–148 (2007).
- [14] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing and H. J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *Int J Food Microbiol*, **144**, 51–63 (2010).

- [15] E. K. Mooney, C. Lippitt, J. Friedman and D. C. Plastic Surgery Educational Foundation, Silver dressings, *Plast Reconstr Surg*, **117**, 666–669 (2006).
- [16] J. W. Loh, G. Yeoh, M. Saunders and L. Y. Lim, Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, **249**, 148–157 (2010).
- [17] V. K. Poon and A. Burd, In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care, *Burns*, **30**, 140–147 (2004).
- [18] M. V. Park, A. M. Neigh, J. P. Vermeulen, L. J. de la Fonteyne, H. W. Verharen, J. J. Briede, H. van Loveren and W. H. de Jong, The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles, *Biomaterials*, **32**, 9810–9817 (2011).
- [19] R. E. Hancock and H. G. Sahl, Antimicrobial and host–defense peptides as new anti–infective therapeutic strategies, *Nat Biotechnol*, **24**, 1551–1557 (2006).
- [20] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, **415**, 389–395 (2002).
- [21] A. Parisien, B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville and C. Q. Lan, Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides, *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 1–13 (2008).
- [22] J. L. Fox, Antimicrobial peptides stage a comeback, *Nat Biotech*, **31**, 379–382 (2013).

- [23] G. Wang, Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles, *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 32637–32643 (2008).
- [24] B. Jacob, I. S. Park, J. K. Bang and S. Y. Shin, Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL-37 possessing both antimicrobial and antiendotoxic activities without mammalian cell toxicity, *Journal of Peptide Science*, **19**, 700–707 (2013).
- [25] B. Mishra, R. F. Epand, R. M. Epand and G. Wang, Structural location determines functional roles of the basic amino acids of KR-12, the smallest antimicrobial peptide from human cathelicidin LL-37, *RSC Adv*, **3**, 19560–19571 (2013).
- [26] D. Vandamme, B. Landuyt, W. Luyten and L. Schoofs, A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide, *Cell Immunol*, **280**, 22–35 (2012).
- [27] Y. Rosenfeld, N. Papo and Y. Shai, Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 1636–1643 (2006).
- [28] N. Mookherjee, K. L. Brown, D. M. Bowdish, S. Doria, R. Falsafi, K. Hokamp, F. M. Roche, R. Mu, G. H. Doho, J. Pistolic, J. P. Powers, J. Bryan, F. S. Brinkman and R.

- E. Hancock, Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37, *J Immunol*, **176**, 2455–2464 (2006).
- [29] G. S. Tjabringa, J. Aarbiou, D. K. Ninaber, J. W. Drijfhout, O. E. Sorensen, N. Borregaard, K. F. Rabe and P. S. Hiemstra, The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor, *J Immunol*, **171**, 6690–6696 (2003).
- [30] J. D. Heilborn, M. F. Nilsson, G. Kratz, G. Weber, O. Sorensen, N. Borregaard and M. Stahle-Backdahl, The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 is Involved in Re-Epithelialization of Human Skin Wounds and is Lacking in Chronic Ulcer Epithelium, *J Invest Dermatol*, **120**, 379–389 (2003).
- [31] S. Tokumaru, K. Sayama, Y. Shirakata, H. Komatsuzawa, K. Ouhara, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, H. Nagai, L. Yang, S. Higashiyama, A. Yoshimura, M. Sugai and K. Hashimoto, Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37, *J Immunol*, **175**, 4662–4668 (2005).
- [32] R. Shaykhiev, C. Beisswenger, K. Kandler, J. Senske, A. Puchner, T. Damm, J. Behr and R. Bals, Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial

- cell proliferation and wound closure, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **289**, L842–848 (2005).
- [33] T. Akiyama, F. Niyonsaba, C. Kiatsurayanon, T. T. Nguyen, H. Ushio, T. Fujimura, T. Ueno, K. Okumura, H. Ogawa and S. Ikeda, The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function, *J Innate Immun*, **6**, 739–753 (2014).
- [34] R. Koczulla, G. von Degenfeld, C. Kupatt, Kr, xF, F. tz, S. Zahler, T. Gloe, Issbr, xFc, K. cker, P. Unterberger, M. Zaiou, C. Lebherz, A. Karl, P. Raake, A. Pfosser, P. Boekstegers, U. Welsch, P. S. Hiemstra, C. Vogelmeier, R. L. Gallo, M. Clauss and R. Bals, An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18, *The Journal of Clinical Investigation*, **111**, 1665–1672 (2003).
- [35] M. Carretero, M. J. Escamez, M. Garcia, B. Duarte, A. Holguin, L. Retamosa, J. L. Jorcano, M. D. Rio and F. Larcher, In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37, *J Invest Dermatol*, **128**, 223–236 (2008).
- [36] R. Ramos, J. P. Silva, A. C. Rodrigues, R. Costa, L. Guardao, F. Schmitt, R. Soares, M. Vilanova, L. Domingues and M. Gama, Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37, *Peptides*, **32**,

- 1469–1476 (2011).
- [37] S. Maher and S. McClean, Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro, *Biochemical Pharmacology*, **71**, 1289–1298 (2006).
- [38] F. F. Han, Y. F. Liu, Y. G. Xie, Y. H. Gao, C. Luan and Y. Z. Wang, Antimicrobial peptides derived from different animals: comparative studies of antimicrobial properties, cytotoxicity and mechanism of action, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **27**, 1847–1857 (2011).
- [39] M. Bacalum and M. Radu, Cationic Antimicrobial Peptides Cytotoxicity on Mammalian Cells: An Analysis Using Therapeutic Index Integrative Concept, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **21**, 47–55 (2015).
- [40] A. Gronberg, L. Zettergren and M. S. Agren, Stability of the cathelicidin peptide LL-37 in a non-healing wound environment, *Acta Dermato-venereologica*, **91**, 511–515 (2011).
- [41] X. Li, P. Li, R. Saravanan, A. Basu, B. Mishra, S. H. Lim, X. Su, P. A. Tambyah and S. S. Leong, Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties, *Acta Biomaterialia*, **10**, 258–266 (2014).

- [42] B. Mishra, A. Basu, R. R. Y. Chua, R. Saravanan, P. A. Tambyah, B. Ho, M. W. Chang and S. S. J. Leong, Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens, *J. Mater. Chem. B*, **2**, 1706–1716 (2014).
- [43] K. Lim, R. R. Chua, H. Bow, P. A. Tambyah, K. Hadinoto and S. S. Leong, Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptide coating with antimicrobial and antibiofilm properties, *Acta Biomaterialia*, **15**, 127–138 (2015).
- [44] G. Gao, D. Lange, K. Hilpert, J. Kindrachuk, Y. Zou, J. T. Cheng, M. Kazemzadeh–Narbat, K. Yu, R. Wang, S. K. Straus, D. E. Brooks, B. H. Chew, R. E. Hancock and J. N. Kizhakkedathu, The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides, *Biomaterials*, **32**, 3899–3909 (2011).
- [45] K. V. Holmberg, M. Abdolhosseini, Y. Li, X. Chen, S. U. Gorr and C. Aparicio, Bio–inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications, *Acta Biomaterialia*, **9**, 8224–8231 (2013).
- [46] W. Lin, C. Junjian, C. Chengzhi, S. Lin, L. Sa, R. Li and W. Yingjun, Multi–biofunctionalization of a titanium surface with a mixture of peptides to achieve excellent antimicrobial activity and biocompatibility, *J. Mater.*

- Chem. B*, **3**, 30–33 (2015).
- [47] X. W. Tan, T. W. Goh, P. Saraswathi, C. L. Nyein, M. Setiawan, A. Riau, R. Lakshminarayanan, S. Liu, D. Tan, R. W. Beuerman and J. S. Mehta, Effectiveness of antimicrobial peptide immobilization for preventing perioperative cornea implant–associated bacterial infection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**, 5229–5238 (2014).
- [48] M. Pedrosa, C. Mouro, F. Nogueira, J. Vaz and I. Gouveia, Comparison of the Antibacterial Activity of Modified–Cotton with Magainin I and LL–37 with Potential as Wound–Dressings, *Journal of Applied Polymer Science*, **131** (2014).
- [49] A. P. Gomes, J. F. Mano, J. A. Queiroz and I. C. Gouveia, Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications, *Carbohydr Polym*, **127**, 451–461 (2015).
- [50] T. D. Heunis, C. Smith and L. M. Dicks, Evaluation of a nisin–eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*–induced skin infections in mice, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 3928–3935 (2013).
- [51] H. J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman and D. L. Kaplan, Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats, *Biomaterials*, **25**, 1039–1047 (2004).
- [52] C. S. Ki, S. Y. Park, H. J. Kim, H. M. Jung, K. M. Woo,

- J. W. Lee and Y. H. Park, Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration, *Biotechnol Lett*, **30**, 405–410 (2008).
- [53] S. Y. Park, C. S. Ki, Y. H. Park, H. M. Jung, K. M. Woo and H. J. Kim, Electrospun silk fibroin scaffolds with macropores for bone regeneration: an in vitro and in vivo study, *Tissue Engineering. Part A*, **16**, 1271–1279 (2010).
- [54] H. H. Kim, J. B. Park, M. J. Kang and Y. H. Park, Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid-dopamine conjugate, *International Journal of Biological Macromolecules*, **70**, 516–522 (2014).
- [55] S. S. Silva, A. Motta, M. T. Rodrigues, A. F. Pinheiro, M. E. Gomes, J. F. Mano, R. L. Reis and C. Migliaresi, Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies, *Biomacromolecules*, **9**, 2764–2774 (2008).
- [56] Y. W. Cheon, W. J. Lee, H. S. Baek, Y. D. Lee, J. C. Park, Y. H. Park, C. S. Ki, K. H. Chung and D. K. Rah, Enhanced chondrogenic responses of human articular chondrocytes onto silk fibroin/wool keratose scaffolds treated with microwave-induced argon plasma, *Artif Organs*, **34**, 384–392 (2010).
- [57] R. Ghassemifar, S. Redmond, Zainuddin and T. V.

- Chirila, Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes, *J Biomater Appl*, **24**, 591–606 (2010).
- [58] O. J. Lee, J. M. Lee, J. H. Kim, J. Kim, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo and C. H. Park, Biodegradation behavior of silk fibroin membranes in repairing tympanic membrane perforations, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, **100**, 2018–2026 (2012).
- [59] B. G. Cha, H. W. Kwak, A. R. Park, S. H. Kim, S. Y. Park, H. J. Kim, I. S. Kim, K. H. Lee and Y. H. Park, Structural characteristics and biological performance of silk fibroin nanofiber containing microalgae spirulina extract, *Biopolymers*, **101**, 307–318 (2014).
- [60] A. R. Park, Y. H. Park, H. J. Kim, M. K. Kim, S. G. Kim, H. Y. Kweon and S. C. Kundu, Tri-layered silk fibroin and poly- ϵ -caprolactone small diameter vascular grafts tested in vitro and in vivo, *Macromol. Res.*, **23**, 924–936 (2015).
- [61] D. Aytemiz, W. Sakiyama, Y. Suzuki, N. Nakaizumi, R. Tanaka, Y. Ogawa, Y. Takagi, Y. Nakazawa and T. Asakura, Small-diameter silk vascular grafts (3 mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge, *Adv Healthc Mater*, **2**, 361–368 (2013).
- [62] B. M. Min, L. Jeong, Y. S. Nam, J. M. Kim, J. Y. Kim

- and W. H. Park, Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, **34**, 281–288 (2004).
- [63] B. M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee and W. H. Park, Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, **25**, 1289–1297 (2004).
- [64] A. Schneider, X. Y. Wang, D. L. Kaplan, J. A. Garlick and C. Egles, Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing, *Acta Biomaterialia*, **5**, 2570–2578 (2009).
- [65] C. R. Yoo, I. S. Yeo, K. E. Park, J. H. Park, S. J. Lee, W. H. Park and B. M. Min, Effect of chitin/silk fibroin nanofibrous bicomponent structures on interaction with human epidermal keratinocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 324–334 (2008).
- [66] D. H. Roh, S. Y. Kang, J. Y. Kim, Y. B. Kwon, H. Y. Kweon, K. G. Lee, Y. H. Park, R. M. Baek, C. Y. Heo, J. Choe and J. H. Lee, Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat, *Journal of Materials Science–Materials in Medicine*, **17**, 547–552 (2006).
- [67] J. H. Kim, B. S. Shin, J. Y. Jeon, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo, H. S. Lee and K. G. Lee, Tetracycline-incorporated

- Silk Fibroin Films, *International Journal of Industrial Entomology*, **25**, 129–132 (2012).
- [68] S. Viju and G. Thilagavathi, Characterization of tetracycline hydrochloride drug incorporated silk sutures, *Journal of the Textile Institute*, **104**, 289–294 (2013).
- [69] Y. Lan, W. Li, Y. Jiao, R. Guo, Y. Zhang, W. Xue and Y. Zhang, Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns, *Acta Biomaterialia*, **10**, 3167–3176 (2014).
- [70] K. J. Ku, Y. H. Hong and K. B. Song, Preparation of a Silk Fibroin Film Containing Catechin and Its Application, *Food Science and Biotechnology*, **17**, 1203–1206 (2008).
- [71] A. R. Lee, J. U. Hong, Y. A. Yang and E. Yi, Dyeing Properties and Antimicrobial Activity of Silk Fabric with Extract of Unripe Citrus Unshiu Fruits, *Fibers and Polymers*, **11**, 982–988 (2010).
- [72] N. Kasoju and U. Bora, Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, **100**, 1854–1866 (2012).
- [73] Y. Lian, J. C. Zhan, K. H. Zhang and X. M. Mo, Fabrication and characterization of curcumin-loaded silk fibroin/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold, *Frontiers of Materials Science*, **8**, 354–362 (2014).

- [74] V. G. Nadiger and S. R. Shukla, Antimicrobial Activity of Silk Treated with Aloe–Vera, *Fibers and Polymers*, **16**, 1012–1019 (2015).
- [75] M. L. Gulrajani, D. Gupta, S. Periyasamy and S. G. Muthu, Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties, *Journal of Applied Polymer Science*, **108**, 614–623 (2008).
- [76] X. Fei, M. Jia, X. Du, Y. Yang, R. Zhang, Z. Shao, X. Zhao and X. Chen, Green synthesis of silk fibroin–silver nanoparticle composites with effective antibacterial and biofilm–disrupting properties, *Biomacromolecules*, **14**, 4483–4488 (2013).
- [77] Z. S. Lu, M. Meng, Y. K. Jiang and J. L. Xie, UV–assisted in situ synthesis of silver nanoparticles on silk fibers for antibacterial applications, *Colloid Surface A*, **447**, 1–7 (2014).
- [78] S. Calamak, E. A. Aksoy, C. Erdogdu, M. Sagiroglu and K. Ulubayram, Silver nanoparticle containing silk fibroin bionanotextiles, *J Nanopart Res*, **17**, 1–9 (2015).
- [79] Z. Lu, J. Xiao, Y. Wang and M. Meng, In situ synthesis of silver nanoparticles uniformly distributed on polydopamine–coated silk fibers for antibacterial application, *Journal of Colloid and Interface Science*, **452**, 8–14 (2015).
- [80] W. C. Jao, M. C. Yang, C. H. Lin and C. C. Hsu, Fabrication and characterization of electrospun silk

- fibroin/TiO₂ nanofibrous mats for wound dressings, *Polymers for Advanced Technologies*, **23**, 1066–1076 (2012).
- [81] Z. X. Cai, X. M. Mo, K. H. Zhang, L. P. Fan, A. L. Yin, C. L. He and H. S. Wang, Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound–dressing applications, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 3529–3539 (2010).
- [82] S. Viju and G. Thilagavathi, Effect of chitosan coating on the characteristics of silk–braided sutures, *Journal of Industrial Textiles*, **42**, 256–268 (2013).
- [83] S. Y. Guang, Y. An, F. Y. Ke, D. M. Zhao, Y. H. Shen and H. Y. Xu, Chitosan/silk fibroin composite scaffolds for wound dressing, *Journal of Applied Polymer Science*, **132** (2015).
- [84] S. Calamak, C. Erdogdu, M. Ozalp and K. Ulubayram, Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials, *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, **43**, 11–20 (2014).
- [85] L. Q. Bai, L. J. Zhu, S. J. Min, L. Liu, Y. R. Cai and J. M. Yao, Surface modification and properties of Bombyx mori silk fibroin films by antimicrobial peptide, *Applied Surface Science*, **254**, 2988–2995 (2008).
- [86] G. L. Chen, M. Y. Zhou, Z. X. Zhang, G. H. Lv, S. Massey, W. Smith and M. Tatouljian, Acrylic Acid Polymer Coatings on Silk Fibers by Room–temperature

- APGD Plasma Jets, *Plasma Processes and Polymers*, **8**, 701–708 (2011).
- [87] P. Wang, Y. Zhou, L. Cui, J. G. Yuan, Q. Wang, X. R. Fan and Y. J. Ding, Enzymatic Grafting of Lactoferrin onto Silk Fibroins for Antibacterial Functionalization, *Fibers and Polymers*, **15**, 2045–2050 (2014).
- [88] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1462**, 1–10 (1999).
- [89] M. Stark, L. P. Liu and C. M. Deber, Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 3585–3590 (2002).
- [90] K. K. Chereddy, C. H. Her, M. Comune, C. Moia, A. Lopes, P. E. Porporato, J. Vanacker, M. C. Lam, L. Steinstraesser, P. Sonveaux, H. Zhu, L. S. Ferreira, G. Vandermeulen and V. Preat, PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing, *Journal of Controlled Release*, **194**, 138–147 (2014).
- [91] I. Lequeux, E. Ducasse, T. Jouenne and P. Thebault, Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide, *European Polymer Journal*, **51**, 182–190 (2014).
- [92] A. Hequet, V. Humblot, J. M. Berjeaud and C. M. Pradier, Optimized grafting of antimicrobial peptides on

- stainless steel surface and biofilm resistance tests, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **84**, 301–309 (2011).
- [93] X. Laloyaux, E. Fautre, T. Blin, V. Purohit, J. Leprince, T. Jouenne, A. M. Jonas and K. Glinel, Temperature-responsive polymer brushes switching from bactericidal to cell-repellent, *Advanced Materials*, **22**, 5024–5028 (2010).
- [94] G. Cado, R. Aslam, L. Seon, T. Garnier, R. Fabre, A. Parat, A. Chassepot, J. C. Voegel, B. Senger, F. Schneider, Y. Frere, L. Jierry, P. Schaaf, H. Kerdjoudj, M. H. Metz-Boutigue and F. Boulmedais, Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide, *Advanced Functional Materials*, **23**, 4801–4809 (2013).
- [95] F. Costa, S. Maia, J. Gomes, P. Gomes and M. C. Martins, Characterization of hLF1–11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity, *Acta Biomaterialia*, **10**, 3513–3521 (2014).
- [96] R. T. Cleophas, J. Sjollem, H. J. Busscher, J. A. Kruijtz and R. M. Liskamp, Characterization and activity of an immobilized antimicrobial peptide containing bactericidal PEG-hydrogel, *Biomacromolecules*, **15**, 3390–3395 (2014).
- [97] R. T. C. Cleophas, M. Riool, H. C. Q. van Ufford, S. A.

- J. Zaat, J. A. W. Kruijtzter and R. M. J. Liskamp, Convenient Preparation of Bactericidal Hydrogels by Covalent Attachment of Stabilized Antimicrobial Peptides Using Thiol–ene Click Chemistry, *Acs Macro Letters*, **3**, 477–480 (2014).
- [98] S. A. Onaizi and S. S. Leong, Tethering antimicrobial peptides: current status and potential challenges, *Biotechnology Advances*, **29**, 67–74 (2011).
- [99] K. H. Lee, C. S. Ki, D. H. Baek, G. D. Kang, D. W. Ihm and Y. H. Park, Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme, *Fibers and Polymers*, **6**, 181–185 (2005).
- [100] P. Ye, Z. K. Xu, J. Wu, C. Innocent and P. Seta, Nanofibrous membranes containing reactive groups: Electrospinning from poly(acrylonitrile–co–maleic acid) for lipase immobilization, *Macromolecules*, **39**, 1041–1045 (2006).
- [101] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli and C. N. Bowman, The Thiol–Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry, *Chemistry of Materials*, **26**, 724–744 (2014).
- [102] M. Bagheri, M. Beyermann and M. Dathe, Immobilization reduces the activity of surface–bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum, *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy*, **53**, 1132–1141 (2009).
- [103] M. Gabriel, K. Nazmi, E. C. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen and A. Zentner, Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity, *Bioconjug Chem*, **17**, 548–550 (2006).
- [104] E. Yuksel and A. Karakecili, Antibacterial activity on electrospun poly(lactide-co-glycolide) based membranes via Magainin II grafting, *Materials science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, **45**, 510–518 (2014).
- [105] K. Hilpert, M. Elliott, H. Jenssen, J. Kindrachuk, C. D. Fjell, J. Korner, D. F. Winkler, L. L. Weaver, P. Henklein, A. S. Ulrich, S. H. Chiang, S. W. Farmer, N. Pante, R. Volkmer and R. E. Hancock, Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity, *Chem Biol*, **16**, 58–69 (2009).
- [106] J. A. Bouwstra, P. L. Honeywell-Nguyen, G. S. Gooris and M. Poncet, Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations, *Prog Lipid Res*, **42**, 1–36 (2003).
- [107] W. Zhang and H. T. Liu, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Res*, **12**, 9–18 (2002).
- [108] T. Efimova, A. M. Broome and R. L. Eckert, A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex

formation, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 34277–34285 (2003).

- [109] G. D. Sharma, J. He and H. E. Bazan, p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 21989–21997 (2003).

Abstract

Multi-functional Silk Fibroin Nanofiber Immobilized with Antimicrobial Motif of Human Cathelicidin Peptide (LL37)

Daewoong Song

Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering

The Graduate School

Seoul National University

In this study, we immobilized antimicrobial motif (Cys-KR12) of human cathelicidin peptide (LL37) on electrospun SF nanofiber matrix using EDC/NHS and thiol-maleimide click chemistry in order to utilize multi-functions of LL37 as wound dressing application. After peptide immobilization, nanofibrous structure was well conserved. Ellman's assay revealed that Cys-KR12 was successfully immobilized on SF nanofiber matrix with high reaction yield (above 90%). As a result of immobilization of

cationic antimicrobial peptide, surface zeta potential was changed from negative to positive. XPS analysis also showed that atomic percent of C–N carbon and N/C ratio increased due to high lysine and arginine content of Cys–KR12.

High bactericidal activity was achieved in K200 and K500 by means of increasing peptide immobilization density above 0.60 nmol/cm². In addition, biofilm was not developed in K200. Furthermore, surface-immobilized Cys–KR12 promoted proliferation of keratinocyte and fibroblast cells with highly differentiated keratinocyte cells and suppressed LPS-induced TNF- α expression of macrophage cells. Consequently, Cys–KR12-immobilized SF nanofiber matrix could be a promising candidate as a wound dressing.

.....
Keywords : silk fibroin, antimicrobial peptide, nanofiber,
wound dressing, immobilization

Student number : 2014–20067



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사학위논문

인간유래 카텔리시딘 펩타이드(LL37)의
항균성 모티프를 고정화한
다기능성 실크피브로인 나노섬유

Multi-functional Silk Fibroin Nanofiber
Immobilized with Antimicrobial Motif of
Human Cathelicidin Peptide (LL37)

2016 년 2 월

서울대학교 대학원
바이오시스템 · 소재학부
바이오소재공학전공
송 대 응

초 록

본 연구에서는 인간유래 카텔리시딘 펩타이드(LL37)가 갖는 항균성 및 다양한 생체활성을 이용하여 다양한 기능성을 갖는 창상피복재를 제조하고자, 전기방사를 통해 제조한 실크피브로인 나노섬유 지지체에 LL37의 항균성 모티프(Cys-KR12)를 EDC/NHS 반응과 티올-말레이미드 반응을 통해 화학적으로 고정화하였다. 고정화 반응 결과 나노섬유의 형태학적 구조가 파괴되지 않고 그대로 유지되었으며, Ellman's assay 결과 모든 조건에서 90% 이상의 높은 반응 수율을 나타냈다. 또한 양전하를 띠는 Cys-KR12의 고정화로 인하여 나노섬유 표면의 전하가 음전하에서 양전하로 바뀌었으며, XPS를 통한 원소 분석 결과에서도 리신과 아르기닌으로 인하여 C-N 결합의 피크와 N/C ratio가 증가하였다. 이를 통해 표면에 Cys-KR12가 성공적으로 고정화되었음을 확인하였다.

Cys-KR12의 고정화 밀도에 따른 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성을 평가한 결과, 고정화 밀도가 0.60 nmol/cm^2 이상인 K200과 K500에서 높은 항균성을 나타냈으며 바이오필름 역시 형성되지 않았다. 더욱이 나노섬유 지지체 표면에 고정화된 Cys-KR12가, 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진하였으며, 지질다당류에 의한 대식세포의 종양괴사인자알파 발현을 효과적으로 억제하였다. 따라서 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체는 항균성뿐만 아니라 다양한 생체활성을 부여할 수 있으므로 다기능성 창상피복재로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

주요어: 실크피브로인, 항균성 펩타이드, 나노섬유, 창상피복재, 고정화

학 번: 2014-20067

목 차

초 록	i
목 차	ii
List of Tables	v
List of Figures	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 문헌연구	6
2.1. 실크피브로인	6
2.1.1. 생체재료로서의 실크피브로인	6
2.1.2. 항균성을 부여한 실크피브로인 지지체	7
2.2. 항균성 펩타이드	8
2.2.1. 항균성 펩타이드의 특징 및 기작	8
2.2.2. 항균성 펩타이드의 다양한 기능성	9
2.2.3. 항균성 펩타이드의 고정화 방법	10
제 3 장 재료 및 방법	12
3.1. 재료	12
3.2. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 제조	12
3.2.1. 전기방사	12

3.2.2. 항균성 펩타이드의 고정화	14
3.3. 표면 특성 분석	14
3.3.1. 형태학적 구조	14
3.3.2. 항균성 펩타이드의 정량	17
3.3.3. 제타 전위 측정	18
3.3.4. 표면 원소 분석	18
3.4. 항균성 평가	19
3.4.1. 박테리아 배양	19
3.4.2. 최소저지농도	19
3.4.3. 지지체의 항균성 평가	20
3.4.4. 지지체의 바이오필름 형성 유무 평가	21
3.5. 세포적합성 평가	21
3.5.1. 세포 배양	21
3.5.2. 세포 독성 평가	22
3.5.3. 세포 증식능 평가	22
3.5.4. 웨스턴 블로팅	23
3.5.5. 면역형광법	25
3.5.6. 효소결합면역흡착측정법	26
3.6. 통계처리	26
 제 4 장 결과 및 고찰	 27
4.1. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 표면 특성	27
4.1.1. 형태학적 구조	27
4.1.2. 고정화 항균성 펩타이드의 정량적 분석	29

4.1.3. 고정화 항균성 펩타이드의 정성적 분석	31
4.2. 고정화 항균성 펩타이드의 항균성	38
4.2.1. 항균성 펩타이드의 최소저지농도	38
4.2.2. 고정화 밀도에 따른 항균성	40
4.2.3. 보관 온도에 따른 항균성	43
4.2.4. 항바이오필름 효과	43
4.3. 고정화 항균성 펩타이드가 세포 거동에 미치는 영향	46
4.3.1. 항균성 펩타이드의 잠재적 세포 독성	46
4.3.2. 각질세포 및 섬유아세포 증식에 미치는 영향	48
4.3.3. 각질세포 분화에 미치는 영향	51
4.3.4. 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향	54
 제 5 장 결 론	 58
 참고문헌	 60
Abstract	80

List of Tables

Table 1	Sample identification with concentrations of Cys-KR12 solution.	16
Table 2	Surface elemental composition of Pristine SF and K200.	37

List of Figures

Figure 1	Chemical structure of Cys–KR12. Peptide sequence is $\text{NH}_2\text{--CKRIVKRIKKWLR--COOH}$. (blue: basic residue, red: hydrophobic residue, green: thiol group of cysteine residue)	13
Figure 2	Reaction scheme for immobilization of Cys–KR12 on SF nanofiber matrix using EDC/NHS and thiol–maleimide chemistry.	15
Figure 3	FE–SEM images of SF nanofiber matrix (A) before and (B) after peptide immobilization; Average fiber diameter and fiber diameter distribution of SF nanofiber matrix (C) before and (D) after peptide immobilization.	28
Figure 4	Immobilization density of Cys–KR12 and reaction yield with various concentrations of Cys–KR12 measured by Ellman’ s assay.	30
Figure 5	Surface zeta potential of Pristine SF, SF–AEM, and K200 measured by ELS at pH 7.0.	32
Figure 6	XPS analysis for characterization of surface elemental composition. Survey scan spectra of (A) Pristine SF and (B) K200; High resolution C1s spectra of (C) Pristine SF and (D) K200.; High resolution N1s spectra of (E) Pristine SF and (F) K200; High resolution O1s spectra of (G) Pristine SF and (H) K200	34

Figure 7	Minimum inhibitory concentrations (MICs) of Cys-KR12 against (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>S. epidermidis</i> , (C) <i>E. coli</i> , and (D) <i>P. aeruginosa</i> measured by broth microdilution method. OD at 600 nm was kinetically measured for monitoring bacterial growth. MIC was 4 $\mu\text{g/mL}$ for <i>E. coli</i> and 8 $\mu\text{g/mL}$ for the others.	39
Figure 8	Surface antimicrobial activity of Pristine SF and Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix measured by modified JIS Z 2801 method.	41
Figure 9	Long-term stability of Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix at (A) 4°C and (B) 37°C storage. Bacterial reduction (%) was calculated based on CFU of Pristine SF.	44
Figure 10	FE-SEM images of 24 h-cultured <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> on Pristine SF (left column) and K200 (right column) to observe biofilm formation.	45
Figure 11	Cytotoxicity of Cys-KR12 on human keratinocyte (HaCaT) and human dermal fibroblast (NHDF) cells measured by MTT assay. Relative cell viability was calculated based on non-treated control. LD50 was calculated by DoseResp sigmoidal curve fitting using Origin software.	47
Figure 12	Fold changes in metabolic activity of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: metabolic activity	

on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF on each day.	49
Figure 13 Fold changes in DNA content of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: DNA content on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF on day 10.	50
Figure 14 (A) Western blot analysis and (B) normalized amount of expressed involucrin by human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF.	52
Figure 15 Immunofluorescence images of human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. (red: F-actin, green: involucrin, blue: nuclei)	53
Figure 16 Expression of $\text{TNF-}\alpha$ by mouse macrophage cells (Raw 264.7) stimulated by LPS (10 ng/mL) for 6 h. Cells were cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500 samples prior to LPS stimulation. TCP and Cys-KR12 peptide (20 $\mu\text{g/mL}$) were used as negative and positive control for each. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF after LPS stimulation.	56

제 1 장 서 론

상처 치료는 의료분야에 있어서 가장 중요한 부분 중 하나이다. 미국의 경우, 만성 창상으로 인하여 연간 650만 명의 환자가 발생하고 있으며, 이로 인한 만성 창상 치료에 사용되는 비용이 연간 25억 달러에 이른다[1]. 특히, 피부 상처의 경우 상처 치료가 제대로 이루어지지 않으면 박테리아에 쉽게 감염된다. 박테리아에 감염되면, 염증 반응이 지속되고 콜라겐 합성이 저해될 뿐만 아니라 피부 세포의 재생피화가 늦춰져 결국 상처 치유가 지연된다[2]. 또한 박테리아가 고체 표면에 부착하여 고착화되면 세포외 고분자 물질(extracellular polymeric substances, EPS)로 둘러싸인 형태의 바이오필름을 형성하게 되는데, 이렇게 바이오필름이 형성되면 면역체계나 항생제에 의해 쉽게 제거가 되지 않고, 내독소를 배출하여 패혈증을 유발하며, 심한 경우 사망에 이르기까지 한다[2, 3]. 따라서 박테리아로 인한 감염 및 바이오필름 형성을 예방하는 것이 상처 치료에 있어서 가장 중요한 부분이다.

일반적으로 상처 치료 시 외부로부터 박테리아의 유입을 차단하고 상처를 빠르게 회복시키기 위해서 상처 부위에 창상피복재를 덮어준다. 창상피복재에는 생체적합성이 우수한 다양한 종류의 천연고분자(실크, 셀룰로오스, 젤라틴, 키토산, 알지네이트 등)와 합성고분자(폴리우레탄, 폴리비닐알코올, 폴리락티드, 폴리카프로락톤 등)가 사용되고 있다[4]. 또한 그 제조 형태에 있어서도 나노섬유, 직물, 부직포, 필름, 폼, 하이드로젤,

하이드로콜로이드, 하이드로파이버 등 다양한 형태가 이용되고 있다[5]. 이 중 실크피브로인(silk fibroin, SF)은 실크 단백질의 주요 성분으로, 기계적 강도가 우수하고 면역반응을 잘 일으키지 않을 뿐만 아니라 생체적합성이 매우 우수하여 생체재료로 각광받고 있다[6]. 더욱이, 실크피브로인은 카르복실기, 아민기, 수산기, 페놀기 등 다양한 관능기를 통하여 쉽게 개질이 가능하다는 장점이 있다[7]. 이러한 이유로 실크피브로인을 기반으로 한 외과용 봉합사나 조직공학용 지지체와 같은 의료용 소재에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[6]. 특히, 실크피브로인은 창상피복재로서 우수한 성능을 보이며, 이에 따라 다양한 형태로 제조되었다[8]. 다양한 제조 방법 중 전기방사법을 이용하여 제조한 나노섬유 지지체는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 구조를 모사할 수 있을 뿐만 아니라 비표면적이 넓어 재료 표면의 개질을 용이하게 해준다는 장점을 갖고 있어, 창상피복재의 제조에 있어 전기방사법이 많이 이용되고 있다[5, 9]. 하지만 실크피브로인 단독으로는 항균성을 갖지 못하기 때문에, 전기방사한 실크피브로인 나노섬유를 창상피복재로 적용함에 있어 항균성 부여를 위한 개질이 반드시 필요하다[10].

일반적으로 피부 상처나 창상피복재의 박테리아 감염 및 바이오필름 형성을 예방하기 위해서 페니실린이나 메티실린과 같은 항생제를 사용해왔다. 하지만 기존 항생제에 대해 내성을 갖는 박테리아가 보고됨에 따라, 기존 항생제의 사용량은 줄어들고 있다[11]. 이에 대한 대안으로 다양한 항균성 물질(사차암모늄 화합물[12], 은 이온 혹은 은 나노입자[13], 키토산과 같은 항균성 고분자[14] 등)을 상처 치료에 시도해왔다. 특히, 은을 함유하는

물질은 우수한 항균성을 갖는 것으로 보고되었다[15]. 하지만 이러한 항균성 물질들 역시 세포 독성이 존재하고 효능이 낮다는 단점이 존재한다[12, 13, 16-18].

이러한 이유로 최근에는 항균성 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)가 항생제의 새로운 대안으로 각광받고 있다. 항균성 펩타이드는 포유류나 곤충, 어류, 양서류, 박테리아 등 다양한 생물체 내에 존재하는 물질로, 외부에서 침입한 박테리아나 곰팡이, 바이러스 등으로부터 생체를 보호하는 기능을 하고 있다[19, 20]. 항균성 펩타이드는 다양한 구조를 갖고 있지만, 주로 알파나선 구조에 양친매성 도메인을 가지며 양전하를 띠는 특징을 갖는다. 그리고 이러한 양친매성 도메인과 양이온성의 구조적 특징을 통해 박테리아의 세포막을 파괴시킴으로써 항균성을 갖는다고 알려져 있다[19, 20]. 또한 항균성 펩타이드는 박테리아에 항균기작을 나타내는 시간이 빠를 뿐만 아니라 효능이 우수하며, 다양한 미생물에 대해 항균성을 나타내는 장점이 있다. 더욱이 항균성 펩타이드는 이미 생체 내에서 미생물에 대한 방어 기작으로 작용하고 있기 때문에, 기존 항생제의 가장 큰 문제점이었던 내성이 아직까지는 보고되지 않아 보다 안전하다는 장점이 있다[21]. 특히, 박테리아로부터 생산한 항균성 펩타이드의 일종인 나이신은 이미 식품 보존제로 미국 식품의약국으로부터 승인을 받아 사용되고 있다. 뿐만 아니라 다수의 제약회사들이 현재 항균성 펩타이드를 치료에 사용하기 위해 개발하고 있으며, 일부는 임상시험 중에 있다[22].

본 실험에 사용한 KR12(KRIVKRIKKWLR)는 인간유래 카텔리시딘 펩타이드(human cathelicidin peptide, LL37)의 가장

짧은 항균성 모티프로 [23-25], LL37은 인체의 다양한 상피 세포나 면역세포에서 분비된다[26]. LL37은 인체 내에서 항균성뿐만 아니라 내독소를 중화시키고[27], 염증 반응을 조절하며[28], 상피 세포의 이동·증식·분화를 통한 재생피화[29-33] 및 신생혈관 재생[34-36]을 통해 상처 치유를 촉진하는 등 다양한 생체활성을 갖는다. 하지만 LL37이 상처 치유에 있어서 이렇게 다양한 기능성을 가짐에도 불구하고, 잠재적인 세포 독성이 존재한다는 점과, 생체 내에서 다양한 효소에 의해 가수분해 될 수 있다는 점 때문에 그 사용이 제한되고 있다[37-40]. 이로 인하여 항균성 펩타이드의 세포 독성을 낮추고 안정성을 향상시키고자, 항균성 펩타이드를 재료 표면에 고정화하는 연구가 진행되어 왔다. 의료용 소재 분야에서는 도뇨관[41-43], 치과 및 정형외과용 임플란트[44-46], 인공 각막[47] 등에 항균성 펩타이드를 고정화한 연구가 보고되었다. 하지만 항균성 펩타이드가 상처 치유에 있어 다양한 기능성을 가짐에서 불구하고, 항균성 펩타이드를 창상피복재에 적용한 사례는 극히 드물며[48-50], 항균성 펩타이드를 재료 표면에 고정화하였을 때 다양한 기능성이 유지되는지에 관한 연구는 아직까지 진행되지 않았다.

본 연구에서는 항균성 펩타이드(Cys-KR12)를 화학적 반응을 통해 전기방사한 실크피브로인 나노섬유 지지체에 고정화하고, 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 표면 특성에 대하여 분석하였다. 그리고 항균성 펩타이드의 고정화 밀도를 달리하여, 병원성 박테리아에 대한 항균성을 평가하였다. 또한 표면에 고정화된 항균성 펩타이드가 각질세포 및 섬유아세포의 증식, 각질세포의 분화, 대식세포에 의한 염증성

시토카인의 발현에 미치는 영향에 대해 평가함으로써, 항균성 펩타이드가 고정화된 실크피브로인 나노섬유 지지체의 다양한 생체활성 부여에 따른 창상피복재로서의 응용가능성을 고찰하였다.

제 2 장 문헌연구

2.1. 실크피브로인

2.1.1. 생체재료로서의 실크피브로인

실크 단백질은 인시목(*Lepidoptera*)이나 거미강(*Arachnida*)과 같은 절지동물이 분비하는 섬유형태의 단백질로, 종에 따라 아미노산 조성이나 물리적 성질 등이 매우 다양하다. 그 중 가잠(*Bombyx mori*)의 누에고치로부터 얻는 실크 단백질은 두 가닥의 실크피브로인 섬유를 실크세리신이 감싸고 있는 구조로, 기계적 강도가 매우 우수하여 오래 전부터 섬유산업에 이용되어 왔다. 실크피브로인은 390kDa의 H사슬과 25kDa의 L사슬이 이황화 결합으로 연결되어 있는 구조로, 실크세리신이 체내에서 면역반응을 일으키는데 반해, 실크피브로인은 면역반응을 일으키지 않고, 생체적합성이 매우 우수하다고 알려져 있다[6].

실크피브로인은 생체적합성이 우수하다는 점 때문에 최근 생체재료로서 많은 연구가 진행되어 왔다. 주로 골재생[51-54], 연골재생[55, 56], 인공고막[57, 58], 인공혈관[59-61] 등 조직공학용 지지체로 이용하고자 하는 시도가 많았으며, 특히 창상피복재로서 우수한 생체적합성을 나타내었다[62-64]. You et al.[65]은 키틴과 실크피브로인을 혼합하여 전기방사한 나노섬유가 키틴으로만 구성된 나노섬유에 비하여 각질세포의 부착 및 확산이 잘 된다고 보고하였으며, Roh et al.[66]은 실크피브로인과 알긴산을 혼합한 스폰지가 상업적으로 판매되는 거즈 형태의 창상피복재에 비하여 상처 치유를 촉진한다고 보고하였다. 또한 Gil

et al.[8]은 실크피브로인을 필름, 층상 구조의 다공성 필름, 전기방사한 나노섬유 세 가지 형태로 제조하고, 상업적으로 판매되는 하이드로콜로이드 형태의 창상피복재와 상처 치유 효과를 비교하였다. 그 결과 전기방사한 나노섬유가 가장 높은 상처 치유 효과를 보이는 것을 확인함으로써, 전기방사한 실크피브로인 나노섬유가 창상피복재로서 우수한 성능을 지님을 확인하였다.

2.1.2. 항균성을 부여한 실크피브로인 지지체

실크피브로인은 그 자체로는 미생물에 대한 항균성이 없기 때문에, 많은 연구진들이 실크피브로인에 항균성을 부여하기 위한 연구를 진행하였는데, 주로 항균성을 갖는 물질을 물리적으로 흡착 또는 혼재시키거나, 화학적으로 고정화하여 실크피브로인에 항균성을 부여하였다.

항균성 물질로는 항생제의 일종인 테트라사이클린[67, 68]과 젠타마이신[69]을 이용하여 실크피브로인에 항균성을 부여한 연구사례가 있었으며, 천연추출물인 카테킨[70], 감귤추출물[71], 커큐민[72, 73], 알로에 베라[74] 등을 이용하여 실크피브로인에 항균성을 부여한 연구사례도 있었다. 최근에는 금속 나노입자인 은 나노입자[75-79]를 이용하여 항균성을 부여하려는 연구가 주를 이루었으며, 티타늄 옥사이드 나노입자[80]를 이용하여 항균성을 부여한 연구사례도 존재했다. 또한 항균성 고분자로 알려진 키토산[81-83]이나 폴리에틸렌이민[84]을 이용하여 항균성을 부여한 사례도 있었으며, 항균성 펩타이드[85-87]를 이용하여 항균성을 부여한 사례도 존재했다.

2.2. 항균성 펩타이드

2.2.1. 항균성 펩타이드의 특징 및 기작

항균성 펩타이드는 인간을 비롯하여 포유류, 식물, 곤충, 어류, 양서류, 박테리아 등 다양한 생물체 내에 존재하는 물질로, 일반적으로 10-50개의 아미노산으로 구성된 작은 크기의 분자이다. 포유류의 경우, 대다수의 항균성 펩타이드가 상피세포나 백혈구에서 만들어지는데, 이는 항균성 펩타이드가 외부로부터 침입한 박테리아나 곰팡이, 바이러스 등으로부터 생체를 보호하는 1차적인 역할을 하기 때문이다[19, 20].

항균성 펩타이드는 기원에 따라 다양한 구조를 갖고 있다. 인간에 존재하는 LL37이나 누에나방에 존재하는 세크로핀, 개구리에 존재하는 마가이닌 같은 경우에는 알파나선 구조를 가지고 있으며, 디펜신 계열의 경우에는 이황화 결합으로 연결된 베타시트 구조를 가지고 있다. 또한 인간에 존재하는 히스타틴이나 소에 존재하는 인돌리시딘의 경우에는 알파나선 구조나 베타시트 구조가 아닌 선형구조를 가지고 있다. 항균성 펩타이드는 같은 종에서조차 서로 다른 구조를 갖지만, 공통적으로 친수성 도메인과 소수성 도메인 모두를 갖는 양친매성 구조에 양전하를 띠는 특징을 지닌다[19, 20].

항균성 펩타이드가 박테리아에 대해 항균성을 나타내는 기작은 앞서 언급한 공통적인 구조적 특징에서 기인한다. 박테리아의 세포막은 산성의 인지질로 구성되어 있어 음전하를 띠기 때문에, 양전하를 띠는 항균성 펩타이드와 정전기적 인력에 의해 가까워지게 되고, 이후 소수성 도메인과 박테리아 세포막의 인지질

부분이 소수성 상호작용에 의하여 결합하게 된다. 세포막과 결합한 항균성 펩타이드의 양이 많아지면, 인지질이 이동하면서 세포막 구조가 바뀌게 되고, 결국 세포막에 구멍이 뚫리거나 세포막이 파괴되게 된다. 세포막이 파괴되면 세포 내부의 칼륨 이온이 바깥으로 빠져 나오기 때문에 박테리아가 죽게 되는 것이다. 반면 진핵세포의 경우 세포막이 양쪽성의 인지질로 구성되어 있고, 콜레스테롤 분자가 세포막에 존재하기 때문에 상대적으로 정전기적 인력이 낮다. 또한 일반적으로 항균성 펩타이드의 소수성은 그리 높지 않기 때문에, 진핵세포의 양쪽성 인지질과는 잘 결합하지 못한다. 따라서 진핵세포에는 독성을 나타내지 않고, 박테리아에 대해서 선택적인 독성을 나타내게 되는 것이다[88, 89].

2.2.2. 항균성 펩타이드의 다양한 기능성

항균성 펩타이드는 항균성뿐만 아니라 생체 내에서 다양한 기능을 수행한다. 특히 인체에 존재하는 여러 항균성 펩타이드 중 유일한 카텔리시딘 계열의 펩타이드인 LL37의 경우 다른 항균성 펩타이드에 비해 매우 다양한 기능을 수행한다. Rosenfeld et al.[27]과 Mookherjee et al.[28]에 따르면 LL37은 그람 음성균의 세포벽 구성물질인 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 중화시키거나 지질다당류의 수용체와 경쟁적으로 결합함으로써, 지질다당류에 의한 대식세포의 염증성 시토카인의 분비를 억제한다고 한다. LL37의 또 다른 기능 중 하나는 상처 치유를 촉진시키는 것이다. LL37은 상피 세포의 이동 및 증식, 분화를 촉진[29-33]시키고 신생혈관 재생을 촉진하는 것으로 알려져 있다[34-36]. Cherreddy et al.[90]은 LL37을

폴리(락티드-글리콜리드) 공중합체 나노입자에 담지하여 쥐의 상처 부위에 투여한 결과, 콜라겐 합성 및 재생피화, 신생혈관 재생이 촉진되었음을 확인하였고, 이를 통해 LL37이 상처 치유에 있어 다양한 기능을 가진다는 것을 확인하였다.

2.2.3. 항균성 펩타이드의 고정화 방법

항균성 펩타이드를 재료 표면에 화학적으로 고정화하는 방법은 그 재료의 표면 특성에 따라 다양하게 달라진다. 주로 항균성 펩타이드의 N-말단이나 결사슬에 존재하는 아민기를 이용하여 재료 표면에 고정화를 하였다. 카르복실기를 갖는 표면의 경우는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS)를 이용하여 아민기와 반응시켜 고정화하였고[85, 91], 에폭시기를 갖는 표면의 경우 아민기에 의한 친핵성 개환반응에 의해 고정화를 하였다[41]. 또한 아민기를 갖는 표면의 경우 글루타르알데히드를 링커로 이용하여 항균성 펩타이드의 아민기와 반응시켜 고정화였다[92]. 하지만 이렇게 항균성 펩타이드의 아민기를 이용하여 고정화할 경우, N-말단과 결사슬의 아민기 모두 반응에 참여할 수 있기 때문에 특이적인 방향으로 고정화할 수 없다는 문제점이 있다.

이에 따라 항균성 펩타이드의 말단에 티올기를 갖는 시스테인을 도입하여 특이적인 방향으로 고정화하는 방법이 제안되었다. 티올기의 경우 말레이미드기의 이중결합에 특이적으로 반응하기 때문에 이를 이용한 방법이 주를 이루었고[93, 94], 티올기를 갖는 표면과 이황화 결합을 통해 고정화한 사례도 있었다[95]. 또한 아크릴기를 갖는 하이드로젤의 경우에는 빛에 의해 하이드로젤

제조와 고정화 반응을 동시에 진행하기도 하였으며[96, 97], 표면을 폴리도파민으로 코팅한 경우에는 티올기와 아민기 모두를 이용하여 고정화하는 것도 가능하였다[43]. 최근에는 항균성 펩타이드 말단에 아자이드기를 도입하여 알킨기를 갖는 표면에 보다 특이적으로 고정화하기도 하였다[46].

제 3 장 재료 및 방법

3.1. 재료

실험에 사용한 재생 실크피브로인은 가잠(*Bombyx mori*) 누에고치로부터 얻었다. 먼저, 건조된 가잠 누에고치를 100℃의 0.3% (w/v) 올레산나트륨과 0.2% (w/v) 탄산나트륨 수용액에서 1시간 동안 정련하여 세리신을 제거하였다. 정련된 누에고치는 증류수로 수세한 뒤 건조하였다. 이후 정련된 누에고치를 1:5의 옥비로 60℃의 9.3 M 브롬화리튬 수용액에서 4시간 동안 용해한 뒤 증류수로 3일간 투석하여 실크피브로인 수용액을 얻었고, 이를 다시 동결 건조하여 스펀지 형태의 재생 실크피브로인을 얻었다.

실험에 사용한 Cys-KR12(CKRIVKRIKKWLR, >95% purity) (Figure 1)는 (주)BeadTech로부터 구입하였으며, 별도로 명시하지 않은 시약은 모두 Sigma Aldrich에서 구입하였다.

3.2. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 제조

3.2.1. 전기방사

전기방사를 위하여 재생 실크피브로인을 포름산에 11% (w/v)로 4시간 동안 용해하여 방사원액을 제조하였다. 이후 방사원액을 주사기에 옮겨 담아 13 kV의 전압, 0.3 mL/h의 유속으로 24시간 동안 황산지 위에 전기방사하였다. 전기방사한 실크피브로인 나노섬유 지지체는 에탄올에 1시간 동안 침지하여 결정화하였다.

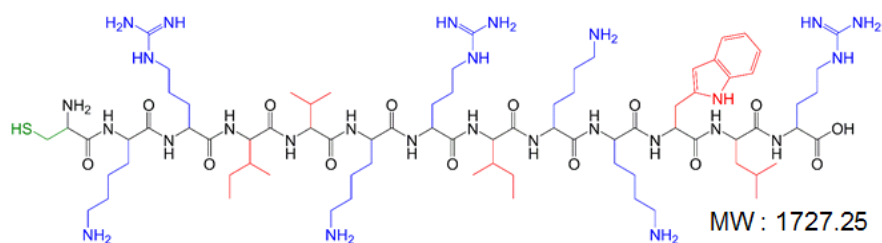


Figure 1. Chemical structure of Cys-KR12. Peptide sequence is $\text{NH}_2\text{-CKRIVKRIKKWLR-COOH}$. (blue: basic residue, red: hydrophobic residue, green: thiol group of cysteine residue)

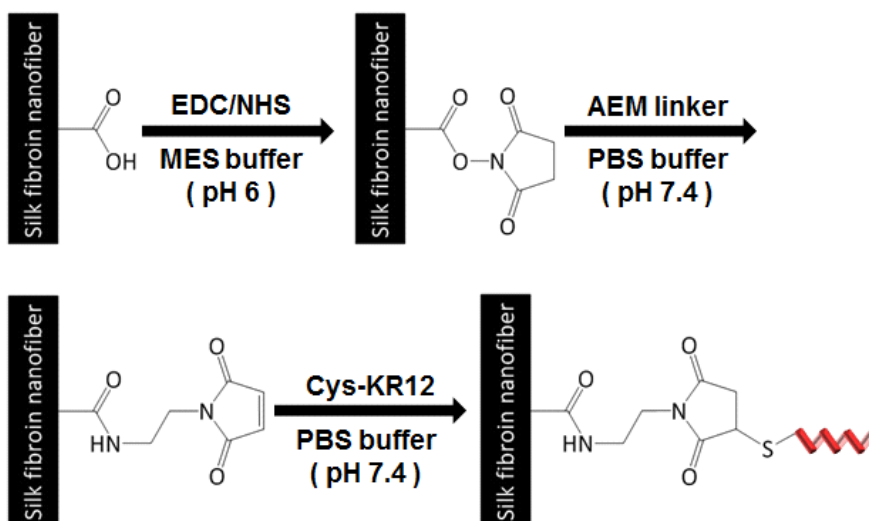
3.2.2. 항균성 펩타이드의 고정화

Cys-KR12를 고정화하기 위한 반응은 EDC/NHS와 티올-말레이미드 반응을 이용하여 3단계로 진행하였다(Figure 2). 먼저, 실크피브로인 나노섬유 지지체를 충분히 수화시키기 위하여 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES) 완충용액(pH 6.0)에 1시간 동안 침지시켰다. 그리고 EDC(0.4 mg/mL)와 NHS(0.6 mg/mL)를 넣고 15분간 반응시켜 카르복실기를 활성화시켰다. 이후 말레이미드기를 도입하기 위하여 pH 7.4의 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에서 N-(2-aminoethyl)maleimide(AEM) 링커(0.2 mg/mL)와 2시간 동안 반응시키고, 반응 후 증류수로 세 번 수세하였다. 마지막으로, AEM 링커가 도입된 실크피브로인 나노섬유 지지체(SF-AEM)를 다양한 농도(50, 100, 200, 500 μ g/mL)의 Cys-KR12 용액에 넣고 pH 7.4의 PBS 완충용액에서 4시간 동안 반응시켜 Cys-KR12를 고정화하였다. 반응이 끝난 후, 미반응물을 제거하기 위하여 증류수로 세 번 수세하였다. 시료명은 고정화에 사용한 Cys-KR12 용액의 농도로 명명하였으며, Table 1에 표기하였다.

3.3. 표면 특성 분석

3.3.1. 형태학적 구조

제조한 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면의 형태학적 구조를 살펴보기 위하여 전계방출형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)(SUPRA, Carl Zeiss, Germany)을 이용하였다. 주사전자현미경 사진 중 섬유 100개를




HS- : Cys-KR12 ($\text{H}_2\text{N-CKRIVKRIKKWLR-COOH}$)

Figure 2. Reaction scheme for immobilization of Cys-KR12 on SF nanofiber matrix using EDC/NHS and thiol-maleimide chemistry.

Table 1. Sample identification with concentrations of Cys–KR12 solution.

Sample ID	Pristine SF	K50	K100	K200	K500
Concentration of Cys–KR12 (μ g/mL)	–	50	100	200	500

임의 선정된 후, Image J 소프트웨어를 이용하여 나노섬유의 평균 직경 및 분포를 측정하였다.

3.3.2. 항균성 펩타이드의 정량

표면에 고정화 된 Cys-KR12의 양은 Ellman' s assay를 이용하여 정량화하였다. 먼저, 고정화 반응 전 용액과 고정화 반응 후 남아 있는 용액 20 μ L를 각각 96-well pate에 옮긴 후, Ellman 시약(5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid), DTNB) (Thermo Scientific, USA) 200 μ L를 넣고 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후 412 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더기(Microplate reader) (Synergy HT, Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. 반응 수율(1) 및 고정화 밀도(2)는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$Y = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

$$d = \frac{(C_i - C_f) \times V}{A} \quad (2)$$

where, Y : reaction yield

d : immobilization density

C_i : initial concentration of the peptide solution

C_f : final concentration of the peptide solution

V : volume of the peptide solution

A : surface area of the nanofiber matrix

나노섬유의 표면적은 나노섬유를 원기둥 모양으로 가정하고 식 (3)과 (4)를 이용하여 계산하였다.

$$V = \frac{m_{air}}{\rho_f} = \pi \left(\frac{D}{2} \right)^2 L \quad (3)$$

$$A = \pi DL = \frac{4m_{air}}{\rho_f D} \quad (4)$$

where, D : mean diameter of the nanofiber

L : length of the nanofiber

m_{air} : mass of the nanofiber matrix in air

ρ_f : density of the nanofiber

나노섬유의 밀도는 공기 중에서의 질량과 헥산 속에서의 질량을 측정하여 이를 다음 식(4)에 대입하여 계산하였다.

$$\rho_f = \frac{m_{air} - m_h}{m_h} \times \rho_h \quad (5)$$

where, m_h : mass of the nanofiber matrix in n-hexane

ρ_h : density of hexane at measured temperature

3.3.3. 제타 전위 측정

항균성 펩타이드의 고정화에 따른 표면 전하의 변화를 확인하기 위하여 전기영동 광산란 광도계(Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer, ELS) (ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan)로 나노섬유 지지체 표면의 제타 전위를 측정하였다. 측정은 pH 7.0의 증류수에 침지하여 나노섬유 지지체를 수화시킨 후 25℃에서 측정하였다.

3.3.4. 표면 원소 분석

항균성 펩타이드 고정화에 따른 표면의 원소 변화를 확인하기

위하여 X선 광전자 분광법(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) (SIGMA PROBE, Thermo Scientific, USA)을 실시하였다. X선원은 Al K_{α} ($h\nu=1486.6$ eV) 단색광을 사용하였으며, 0.0–1000.0 eV 범위를 1.0 eV 간격으로 survey scan 하였다. 고해상도의 XPS 스펙트럼은 C1s의 전자결합에너지인 285.0 eV를 기준으로 하여, C1s(278.0–298.0 eV), N1s(392.0–412.0 eV), O1s(524.0–544.0 eV)를 0.1 eV 간격으로 분석하였다.

3.4. 항균성 평가

3.4.1. 박테리아 배양

항균성 평가 실험에는 2종의 그람 양성균과 2종의 그람 음성균을 사용하였다. 그람 양성균으로는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)과 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228)을 사용하였으며, 그람 음성균으로는 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 9637)과 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15692)을 사용하였다. 박테리아는 Luria–Bertani(LB) (BD Difco) 배지와 한천 평판 위에서 37℃ 조건으로 배양하였다. 접종균액의 농도는 600 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더기로 측정하여 조절하였다.

3.4.2. 최소저지농도

본 실험에 사용한 Cys-KR12의 용액 상태에서의 항균성을 확인하기 위하여, 배지미량희석법(broth microdilution method)을 이용하여 4종의 박테리아에 대하여 최소저지농도(minimum

inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 이를 위하여 Cys-KR12를 PBS 완충용액에 1-40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹여 Cys-KR12 용액을 제조하였다. 이후 96-well polypropylene plate에 Cys-KR12 용액 50 μL 와 접종균액(1×10^6 CFU/mL) 50 μL 를 넣고 37°C에서 20시간 동안 진동 배양하였다. 박테리아의 성장을 확인하기 위해 1시간 간격으로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 최소저지농도는 박테리아의 성장을 저지하는 Cys-KR12 용액의 최소 농도로 정의하였다.

3.4.3. 지지체의 항균성 평가

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성은 JIS Z 2801 방법을 이용하여 4종의 박테리아에 대해 평가하였다. 먼저, 50 μL 의 접종균액(1×10^5 CFU/mL)을 제조한 시료에 접종한 후 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 시료를 24-well plate에 옮겨 1 mL의 PBS 완충용액에 침지시킨 후 5분간 초음파 수조(KODO JAC-4020, 40 kHz)에서 초음파 처리를 하여, 지지체에 붙어 있던 박테리아를 용액 속으로 다시 분산시켰다. 초음파 처리를 하여 분산시킨 박테리아 현탁액을 10배로 단계희석한 후, 50 μL 의 박테리아 현탁액을 다시 LB 한천 평판에 도말하고, 이를 37°C에서 24시간 동안 배양하여 형성된 균락의 수를 측정하였다.

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성이 장시간 안정적으로 유지되는지를 확인하기 위하여 PBS 완충용액에 침지한 후, 3주 동안 37°C와 4°C에서 보관하였다. 1주일 간격으로 보관하고 있던 시료를 꺼내어 전과 동일한

방법으로 황색포도상구균과 대장균에 대하여 항균성을 평가하였다. 정균감소율(bacterial reduction)은 형성된 군락의 수를 측정하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$R = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (6)$$

where, R : bacterial reduction

M_1 : colony forming unit of Pristine SF

M_2 : colony forming unit of K200

3.4.4. 지지체의 바이오필름 형성 유무 평가

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 바이오필름 형성 유무는 FE-SEM으로 확인하였다. 이를 위해 먼저 50 μ L의 접종균액(1×10^6 CFU/mL)을 시료에 접종한 후 37℃에서 24시간 동안 무진동 배양하였다. 이후 시료를 PBS 완충용액으로 세 번 수세한 뒤, 2.5%(v/v) 글루타르알데히드 용액으로 박테리아 세포를 고정화하였고, 다시 고정화된 시료를 FE-SEM 관찰을 위하여 에탄올 수용액으로 탈수하였다.

3.5. 세포적합성 평가

3.5.1. 세포 배양

세포적합성 평가에는 인간유래 각질세포(human keratinocyte, HaCaT), 인간유래 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast, NHDF), 쥐유래 대식세포(murine macrophage, Raw 264.7) 이렇게 3종의 동물세포를 사용하였다. 세포 배양에는 10%(v/v)의

소태아혈청과 1% (v/v)의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 돌베코수정이글배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Corning)를 사용하였으며, 37℃에서 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3.5.2. 세포 독성 평가

본 실험에 사용한 Cys-KR12의 용액 상태에서의 세포 독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 각질세포와 섬유아세포를 각각 96-well plate에 10,000 cells/well의 농도로 접종한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 이후 무혈청배지에 Cys-KR12를 1-1,000 μ g/mL의 농도로 녹인 뒤, 세포 배지를 Cys-KR12 용액으로 바꿔주고 24시간 동안 더 배양하였다. 24시간 배양 후, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 용액 (5 mg/mL) 10 μ L를 세포 배지에 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 형성된 불용성의 포르마잔 결정을 다시 150 μ L의 디메틸설폭시드에 30분간 용해한 뒤, 570 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더기를 통해 측정하였다. 상대적 세포 생존율은 아무 처리를 하지 않은 대조군을 기준으로 계산하였으며, 반수치사량 (lethal dose 50, LD50)은 Origin 소프트웨어를 통해 DoseResp sigmoidal curve fitting을 하여 계산하였다.

3.5.3. 세포 증식능 평가

Cys-KR12가 고정화된 실크피브로인 나노섬유 지지체의 세포 증식능을 평가하기 위하여 각질세포와 섬유아세포의 대사활성 및

DNA 양을 측정하였다. 먼저, 96-well plate에 세 가지 시료(Pristine SF, K200, K500)를 올려놓고, 그 위에 각각의 세포를 2,000 cells/well로 접종하여 10일간 배양하였다.

세포의 대사활성은 CellTiter-Blue[®] cell viability assay를 이용하여 측정하였다. 1, 4, 7, 10일차에 10배 농도의 CellTiter-Blue[®] 시약(Promega) 20 μ L를 200 μ L의 배지에 희석하여 각 well에 넣어준 뒤 5시간 동안 반응시켰다. 이후 세포 배지 150 μ L를 black 96-well plate로 옮긴 뒤, 마이크로 플레이트 리더기로 형광강도(Ex: 560 nm, Em: 590 nm)를 측정하였다.

세포의 DNA 양은 QuantiFluor[®] dsDNA assay를 이용하여 측정하였다. 1, 10일차에 세포를 배양한 지지체를 PBS 완충용액으로 세 번 수세한 후, 1.5 mL 마이크로튜브로 옮겨 담아 TIANamp Genomic DNA kit(Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출 및 정제하였다. 이후 정제된 DNA 시료 100 μ L와 QuantiFluor[®] dsDNA 시약(Promega) 100 μ L를 black 96-well plate에 옮겨 5분간 상온에서 반응시킨 뒤, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 형광강도(Ex: 504 nm, Em: 531 nm)를 측정하였다.

세포의 대사활성 및 DNA 양은 1일차 값에 대한 변화량(fold change)으로 계산하여 표기하였다.

3.5.4. 웨스턴 블로팅(western blotting)

각질세포의 분화 정도를 평가하기 위하여 각질세포의 분화 표지인 인볼루크린(involutrin)을 웨스턴 블로팅하였다. 이를 위해 먼저, 시료(Pristine SF, K200, K500)를 48-well plate에 올려놓고, 그

위에 각질세포를 20,000 cells/well의 농도로 접종하여 10일간 배양하였다. 대조군으로는 시료를 올려놓지 않은 tissue culture plate(TCP)를 사용하였다. 배양된 세포로부터 단백질을 추출하기 위하여, 시료를 세 번 수세한 후 RIPA 완충용액(Amresco)으로 세포를 용해하고, 이를 Amicon[®] Ultra Centrifugal Filter(Merck Millipore)(MWCO 3,000)를 이용하여 농축하였다.

농축된 단백질 추출액의 농도를 BCA assay kit(Thermo Scientific)를 이용하여 측정한 뒤, 같은 농도로 희석하여 SDS-폴리아크릴 아마이드 젤 전기영동(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)을 실시하였다. 젤은 10% 폴리아크릴 아마이드 젤(Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gels, Bio-Rad)을 사용하였다.

전기영동으로 분리한 단백질을 Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System(Bio-Rad)을 이용하여 PVDF(Polyvinyliden difluoride) 막(Bio-Rad)에 옮긴 후, 5%(w/v) 탈지유를 첨가한 PBST(PBS with 0.05% Tween 20) 용액을 처리하여 단백질의 비특이적결합을 차단하였다. 탈지유 처리한 PVDF 막에 1, 2차 항체를 각각 1시간씩 처리하고, 각 처리가 끝날 때마다 30분간 PBST로 세 번씩 수세하였다. 이후 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP) 기질(West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific)을 5분간 처리하고, 이를 CCD 카메라(ChemiDoc[™] XRS+ System, Bio-Rad)로 촬영하여 단백질 밴드 이미지를 얻었다. 1차 항체로는 대조군 단백질인 베타액틴(β -actin) 항체(mouse anti-human beta actin loading control antibody(BA3R), Thermo Scientific)와 분화 표지

단백질인 인볼루크린 항체(mouse anti-human involucrin antibody(SY5), Thermo Scientific)를 사용하였으며, 2차 항체로는 겨자무과산화효소가 포함된 항체(HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Thermo Scientific)를 사용하였다. 1, 2차 항체 희석액은 SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit(Merck Millipore)를 사용하였다.

밴드의 강도는 Image J 소프트웨어를 사용하여 측정하였으며, 베타액틴 대비 인볼루크린 강도(involucrin/ β -actin)를 계산하여 나타내었다.

3.5.5. 면역형광법(immunofluorescence)

각질세포의 분화 정도를 형광현미경으로 관찰하기 위하여 면역형광법을 이용하였다. 앞선 실험과 동일한 조건으로 각질세포를 10일간 배양한 시료를 PBS 완충용액으로 세 번 수세한 후 4%(w/v) 파라포름알데히드 수용액에 10분간 침지시켜 세포를 고정화하였다. 고정화된 세포에 0.25%(v/v)의 Triton X-100과 1%(w/v)의 BSA를 처리한 후, 1차 인볼루크린 항체와 형광표지된 2차 항체(Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Thermo Scientific)를 차례대로 1시간씩 처리하였다. 이후 F-액틴(F-actin)과 세포핵을 염색하기 위하여 각각 로다민-팔로이딘(rhodamine-phalloidin) (Molecular Probe)과 다피(DAPI) (Molecular Probe)로 염색하였다. 염색된 세포의 관찰은 공초점레이저현미경(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) (TCS SP8, Leica)으로 실시하였다.

3.5.6. 효소결합면역흡착측정법

지질다당류에 의한 종양괴사인자알파(TNF- α)의 발현을 효소결합면역흡착측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 측정하였다. 먼저, 시료(Pristine SF, K200, K500)를 96-well plate에 올려놓고, 그 위에 대식세포를 50,000 cells/well의 농도로 접종한 뒤 12시간 동안 배양하였다. 이후 대장균(O111:B4)에서 추출한 지질다당류를 10 ng/mL로 6시간 동안 처리하여 대식세포의 면역반응을 활성화시키고, 이를 ELISA kit(Novex)를 이용하여 측정하였다. 지질다당류를 처리하기 전과 후의 세포 배지 50 μ L를 바이오틴이 결합된 항체(Ms TNF- α Biotin Conjugate) 50 μ L와 함께 포획 항체가 코팅된 96-well plate에 넣어주고 상온에서 90분간 반응시켰다. 이후 streptavidin-HRP 용액 100 μ L를 넣고 30분간 반응시켜준 뒤, TMB(tetramethylbenzidine) 발색체(chromogen) 100 μ L를 넣고 30분간 반응시켰다. 마지막으로 반응을 멈추기 위해 정지액(stop solution) 100 μ L를 넣어준 뒤, 마이크로 플레이트 리더기를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

3.6. 통계처리

정량화된 모든 실험은 세 번씩 반복 실험하였으며, 결과 값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. Pristine SF와 명시한 시료 간의 통계적 유의성은 스튜던트 t-검정을 사용하여 확인하였다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 표면 특성

4.1.1. 형태학적 구조

전기방사를 통해 제조한 나노섬유 지지체는 세포의 기질이 갖는 나노 크기의 섬유상 및 다공성 구조를 재현하여, 세포가 부착하고 증식하는 데 좋은 환경을 제공해주기 때문에, 항균성 펩타이드의 고정화 후에도 이러한 나노섬유 구조를 유지하는 것이 매우 중요하다. **Figure 3**은 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 항균성 펩타이드를 고정화하기 전과 후의 주사전자현미경 사진이다. **Figure 3A**를 통해 본 실험에서 사용한 전기방사 조건 하에서 비드(bead)없이 가느다란 나노섬유가 잘 방사되었다는 것을 확인할 수 있었고, **Figure 3B**를 통해 Cys-KR12를 고정화한 후에도 이러한 나노섬유 구조가 유지된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 **Figure 3C**와 **3D**를 통해 확인할 수 있듯이, Cys-KR12를 고정화한 후의 실크피브로인 나노섬유 지지체의 평균 섬유 직경은 356 ± 55 nm로, 고정화 전의 평균 섬유 직경인 354 ± 66 nm와 차이가 없었으며, 섬유 직경 분포 역시 200–600 nm 범위에서 비슷한 분포를 갖는 것을 확인하였다.

따라서 본 실험에서 사용한 EDC/NHS 반응과 티올-말레이미드 반응이 나노섬유 지지체의 형태학적 구조에 영향을 끼치지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 언급하였듯이 나노섬유 지지체를 생체재료로 활용함에 있어서 매우 중요한 요소이기에, 본 실험에

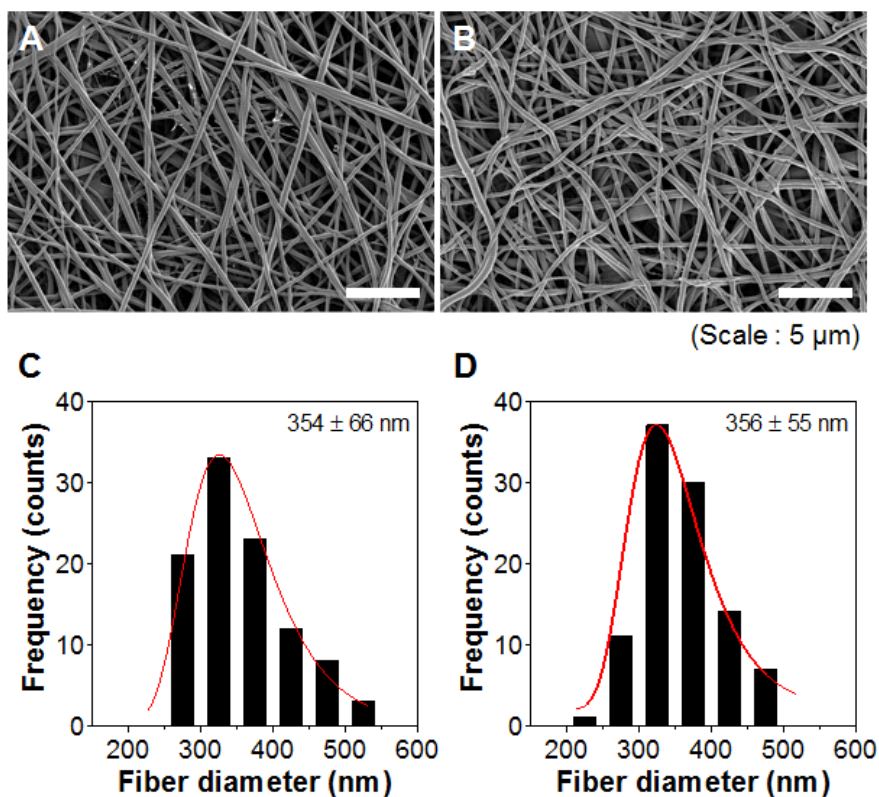


Figure 3. FE-SEM images of SF nanofiber matrix (A) before and (B) after peptide immobilization; Average fiber diameter and fiber diameter distribution of SF nanofiber matrix (C) before and (D) after peptide immobilization.

사용한 EDC/NHS 반응과 티올-말레이미드 반응이 나노섬유 지지체의 화학적 개질 반응에 적합한 반응이라는 사실을 알 수 있다.

4.1.2. 고정화 항균성 펩타이드의 정량적 분석

항균성 펩타이드를 표면에 고정화하는 경우 펩타이드의 고정화 밀도와 고정화 방향, 스페이서(spacer)의 길이나 유연성 등에 의해 활성이 크게 달라진다[98]. 본 연구에서는 Cys-KR12 용액의 농도를 달리함으로써 표면에 고정화된 Cys-KR12의 고정화 밀도를 조절하였다. **Figure 4**는 Cys-KR12 용액의 농도에 따른 고정화 밀도와 반응 수율을 나타낸 그래프이다. Cys-KR12 용액의 농도를 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 500 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가시킴에 따라 Cys-KR12의 고정화 밀도는 0.15 nmol/cm^2 에서 1.43 nmol/cm^2 로 거의 비례하게 증가하였다. 고정화 반응의 수율 역시 Cys-KR12의 농도를 증가시킴에 따라 95.9%에서 91.0%로 다소 감소하기는 하였으나, 모든 조건에서 90% 이상의 높은 수치를 나타냈다.

이처럼 매우 높은 반응 수율은 두 가지 요소에 기인한 것으로 생각된다. 첫 번째는 나노섬유가 가지는 형태학적 구조에 기인한다. 전기방사로 제조한 나노섬유는 다른 제조형태에 비하여 매우 큰 비표면적과 다공성 구조를 갖는다. Lee et al.[99]은 전기방사로 제조한 실크피브로인 나노섬유에 글루타르알데히드를 이용하여 알파키모트립신을 고정화한 결과, 정련한 실크피브로인 섬유나 세리신을 함유한 실크피브로인 섬유에 비하여 5배 정도 높은 고정화 효율을 보였다. Ye et al.[100] 역시 전기방사한

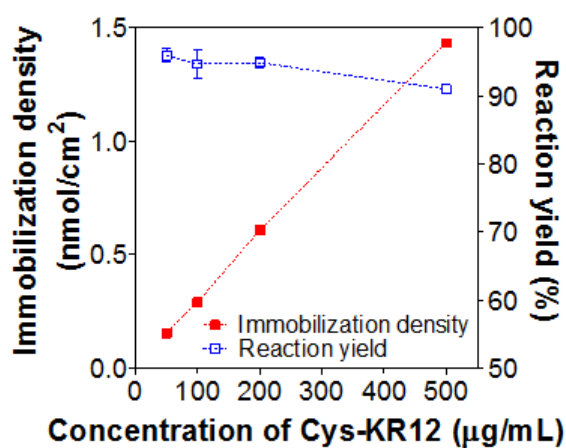


Figure 4. Immobilization density of Cys-KR12 and reaction yield with various concentrations of Cys-KR12 measured by Ellman' s assay.

폴리(아크릴로니트릴-말레산) 공중합체 나노섬유에 리파아제를 고정화한 결과, 중공사에 비하여 10배 정도 높은 고정화 효율을 보였다.

두 번째는 티올-말레이미드 반응의 높은 반응성에 기인한다. 티올-말레이미드 반응은 마이클 첨가반응의 한 형태로, 친핵체가 알파베타 불포화 카보닐 화합물의 베타 위치에 첨가되는 친핵성 첨가반응이다. 특히, 티올기는 친핵체 중에서도 전지밀도가 높은 반면, 말레이미드의 C=C 결합은 결합각 왜곡과 고리 변형 및시스 형태의 카보닐기로 인하여 다른 마이클 공여기보다 반응성이 매우 높다[101].

따라서 전기방사로 제조한 나노섬유의 형태학적 구조와 더불어 티올-말레이미드 반응의 높은 반응성으로 인하여, Cys-KR12가 높은 수율로 고정화되었다고 생각된다.

4.1.3. 고정화 항균성 펩타이드의 정성적 분석

Figure 5는 Cys-KR12를 고정화하였을 때 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면의 제타 전위 변화를 나타낸 그래프이다. 아무런 처리를 하지 않은 Pristine SF는 표면이 음전하를 띠는데, 이는 실크피브로인의 등전점이 약 pH 4.5 부근이기 때문이다. 단백질의 등전점은 분자 내 양전하를 띠는 작용기와 음전하를 띠는 작용기의 전하량 합이 같아, 전체적으로 중성을 띠게 되는 pH를 말한다. 등전점보다 pH가 높게 되면 산성 작용기가 염기성 작용기보다 많이 이온화되어 전체적으로 음전하를 띠게 된다. 반대로 등전점보다 pH가 낮게 되면 염기성 작용기가 산성 작용기보다 많이 이온화되어 전체적으로 양전하를 띠게 된다.

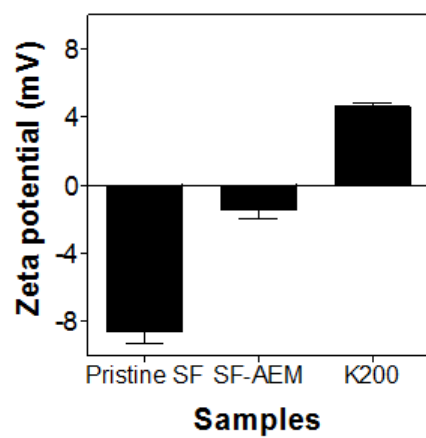


Figure 5. Surface zeta potential of Pristine SF, SF-AEM, and K200 measured by ELS at pH 7.0.

따라서 등전점보다 높은 pH 7.0에서 Pristine SF가 음전하를 띠는 것이다. SF-AEM의 경우에는 표면이 음전하를 띠고 있긴 하지만, Pristine SF에 비하여 표면의 음전하 값이 감소하였다. 이는 산성 작용기인 카르복실기가 AEM 링커의 아민기와 반응하여 아마이드 결합을 형성함에 따라, 이온화될 수 있는 카르복실기의 수가 줄어들었기 때문이다. 반면, K200의 경우 표면전하가 음전하에서 양전하로 바뀌었는데, 이는 양전하를 띠는 양이온성의 Cys-KR12가 고정화되었기 때문이다. Cys-KR12의 순전하량(net charge)은 +7로, **Figure 1**에서 볼 수 있듯이 아미노산 서열 13개 중 산성 아미노산은 존재하지 않으며 C-말단의 카르복실기가 유일한 산성 작용기이다. 반면 N-말단을 제외한 염기성 아미노산은 아미노산 서열 13개 중 총 7개로, 아민기를 갖는 리신이 4개, 구아니딘기를 갖는 아르기닌이 3개 존재한다. 따라서 Cys-KR12의 고정화에 따른 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면의 제타 전위 변화는 양전하를 띠는 Cys-KR12의 고정화에 기인한다. Lequeux et al.[91] 역시 히알루론산에 항균성 펩타이드인 나이신을 고정화하고 용액 상태에서의 제타 전위를 측정한 결과, 고정화된 양이 증가할수록 음전하 값이 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 제타 전위 변화를 통해 Cys-KR12가 성공적으로 고정화되었음을 확인하였다.

이러한 변화는 XPS를 이용한 표면의 원소 분석 결과에서도 동일하게 나타난다. **Figure 6A**와 **6B**는 각각 Pristine SF와 K200의 survey scan 스펙트럼으로, 단백질을 구성하는 원소인 탄소(C1s), 질소(N1s), 산소(O1s)가 모두 존재하는 것이 확인되었다. **Figure 6C**부터 **6H**는 각각의 원소에 대한 고해상도

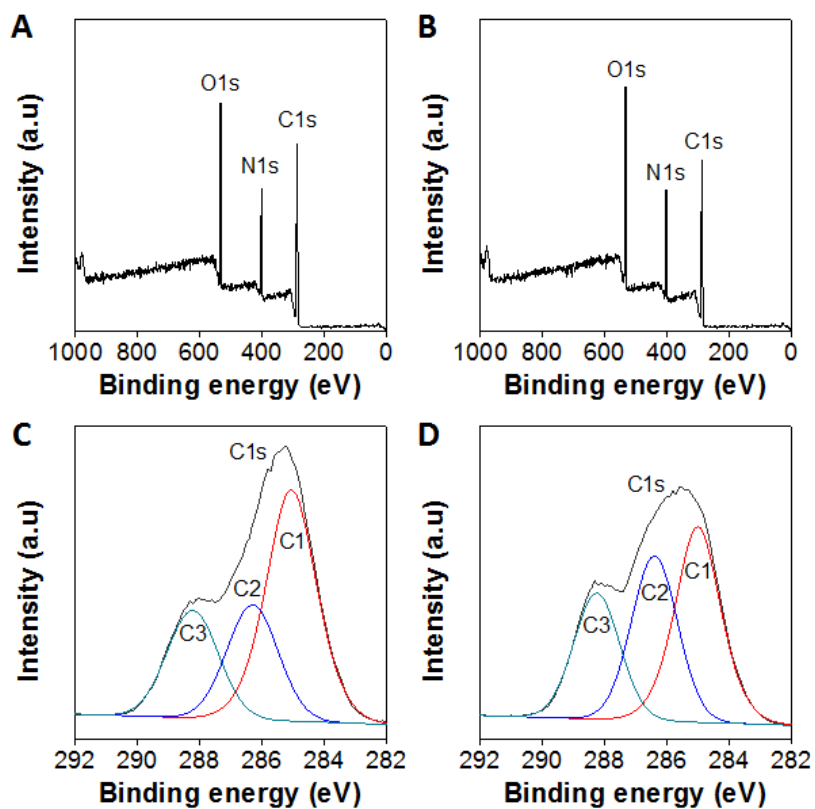


Figure 6. XPS analysis for characterization of surface elemental composition. Survey scan spectra of (A) Pristine SF and (B) K200; High resolution C1s spectra of (C) Pristine SF and (D) K200; High resolution N1s spectra of (E) Pristine SF and (F) K200; High resolution O1s spectra of (G) Pristine SF and (H) K200.

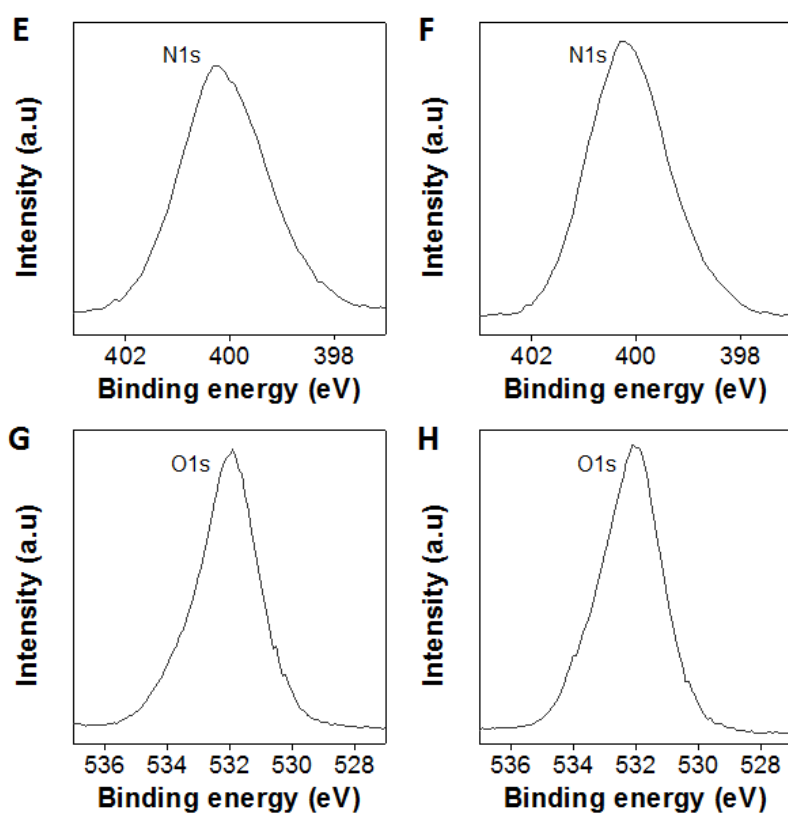


Figure 6. (continued)

XPS 스펙트럼이다. **Figure 6E**와 **6F**, **6G**와 **6H**에서 볼 수 있듯이, 질소와 산소의 고해상도 XPS 스펙트럼에서는 큰 차이를 발견하지 못했다. 하지만 Cys-KR12를 고정화하기 전(**Figure 6C**)과 후(**Figure 6D**)의 탄소의 고해상도 XPS 스펙트럼에서는 차이가 존재했다. C1s의 피크는 크게 지방족 탄소인 C-C나 C-H에 해당하는 C1(285.0 eV), C-N이나 C-O 결합에 해당하는 C2(286.5 eV), 펩타이드의 주사슬인 O=C-N 결합에 해당하는 C3(288.5 eV)로 분리된다. **Table 2**는 C1s의 각 피크별 원자백분율(atomic percent, at%)을 나타낸 것인데, Cys-KR12를 고정화하였을 때 펩타이드의 주사슬인 O=C-N 함량에는 큰 변화가 없으나, 지방족 탄소에 해당하는 C-C나 C-H의 함량은 줄고 C-N이나 C-O의 함량은 증가하였다. 또한 N1s와 C1s의 상대적 원자백분율 비(N/C ratio) 역시 Cys-KR12의 고정화 이후에 0.22에서 0.24로 증가하였다. 이는 상대적으로 질소 함량이 높은 Cys-KR12의 고정화 때문이다. 앞서 언급하였듯이 Cys-KR12는 아민기와 구아니딘기를 갖는 리신과 아르기닌을 다수 포함하고 있는 반면, 실크피브로인은 리신(0.2mol%)과 아르기닌(0.3mol%) 함량이 매우 낮고, 결정 구조 역시 주로 GAGAGS나 GAGAGY로 이루어져 있다. 따라서 Cys-KR12가 실크피브로인에 비하여 상대적으로 질소 함량이 높기 때문에, 고정화 이후에 C1s 피크에서 C-N 결합에 해당하는 피크의 원자백분율이 높아지고 N/C ratio가 증가한 것이다. 이러한 결과는 Cys-KR12의 고정화 이후에 표면 전하가 음전하에서 양전하로 바뀐 것과 상응한다. Bai et al.[85] 역시 실크피브로인 필름에 항균성 펩타이드인 세크로핀을 고정화한 후 XPS로 분석한 결과, N/C ratio가 0.24에서 0.26으로

Table 2. Surface elemental composition of Pristine SF and K200.

Sample	Pristine SF	K200
C1(at%) (C–C, C–H)	51.26	40.75
C2(at%) (C–N, C–O)	25.14	33.61
C3(at%) (O=C–N)	23.60	25.64
C1s(at%)	81.79	80.63
N1s(at%)	18.21	19.37
N/C ratio	0.22	0.24

증가하였다. 따라서 XPS 분석을 통해 Cys-KR12가 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 성공적으로 고정화되었음을 다시 한 번 확인하였다.

4.2. 고정화 항균성 펩타이드의 항균성

4.2.1. 항균성 펩타이드의 최소저지농도

항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성을 평가하기에 앞서, KR12의 N-말단에 시스테인을 도입한 Cys-KR12가 항균성을 유지하는지 확인하였다. 일반적으로 어떤 물질이 박테리아에 대해 항균성을 갖는지는 최소저지농도를 측정하여 확인한다. 현탁액은 구성 입자의 수가 증가할수록 빛이 산란되기 때문에 투과도가 낮아지는데, 박테리아 현탁액 역시 박테리아의 수가 증가할수록 600 nm 파장에서의 투과도가 낮아진다. 따라서 600 nm 파장에서의 흡광도가 증가하지 않는 것은 박테리아가 성장하지 않는 것을 의미하며, 이러한 최소 농도를 최소저지농도라 한다.

Figure 7은 4종의 병원성 박테리아에 대한 최소저지농도 측정 결과이다. 대장균의 경우 Cys-KR12의 농도가 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 때 더 이상 박테리아가 성장하지 않았으며, 이를 제외한 나머지 세 가지 균주는 8 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 때 박테리아 수가 증가하지 않았다. KR12의 최소저지농도는 1-8 μM 로 알려져 있다[24]. 따라서 최소저지농도 측정 결과를 통해 N-말단에 시스테인을 도입한 Cys-KR12가 항균성을 유지함을 확인하였다.

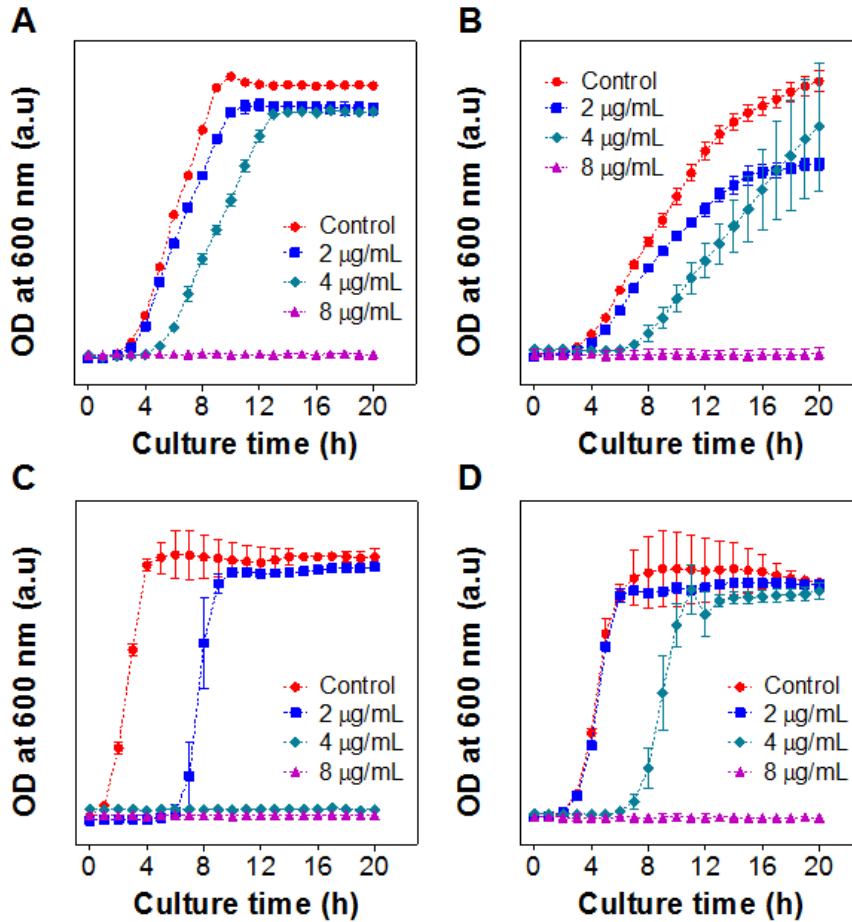


Figure 7. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of Cys-KR12 against (A) *S. aureus*, (B) *S. epidermidis*, (C) *E. coli*, and (D) *P. aeruginosa* measured by broth microdilution method. OD at 600 nm was kinetically measured for monitoring bacterial growth. MIC was 4 µg/mL for *E. coli* and 8 µg/mL for the others.

4.2.2. 고정화 밀도에 따른 항균성

Figure 8은 Cys-KR12의 고정화 밀도에 따른 실크피브로인 나노섬유 지지체의 항균성을 평가한 결과다. K50과 K100의 경우 Pristine SF에 비하여 살아있는 박테리아의 수가 적긴 하였지만 여전히 생존하고 있는 박테리아가 존재하였으며, 일부 균주에 대해서는 초기 접종한 개체 수보다 증가하기도 하여 실질적으로 항균성을 갖는다고 볼 수 없었다. 반면 보다 많은 양의 항균성 펩타이드가 고정화된 K200과 K500의 경우 모든 박테리아가 사멸하였다. 따라서 K200의 고정화 밀도인 0.60 nmol/cm^2 가 높은 항균성을 나타내는 최소 고정화 밀도임을 확인하였다.

앞서 언급하였듯이 표면에 고정화된 항균성 펩타이드의 활성은 고정화 밀도와 고정화 방향, 스페이서의 길이나 유연성 등에 의해 달라진다. Bagheri et al.[102]은 표면에 항균성 펩타이드를 고정화할 경우 활성이 감소하기 때문에 활성을 유지하기 위해서는 길이가 긴 스페이서가 필요하다고 주장하였고, Gabriel et al.[103] 역시 항균성 펩타이드를 고정화할 경우 입체 장애가 존재하기 때문에 충분한 길이의 유연한 스페이서가 있어야 항균성 펩타이드가 활성을 잃지 않는다고 주장하였다. 하지만 본 연구에서 사용한 AEM 링커는 그 길이가 탄소 5개 길이 정도밖에 되지 않는 매우 짧은 스페이서임에도 불구하고 높은 항균성을 갖는 지지체를 제조할 수 있었다. 실제로 최근에는 스페이서를 사용하지 않거나 짧은 길이의 스페이서를 사용하고도 높은 항균성을 나타낸다는 연구결과가 보고되었다[43, 96, 104].

이렇게 짧은 스페이서를 사용했음에도 불구하고 높은 항균성을 가진 이유는 두 가지 요소에 기인한다고 생각된다. 먼저, 항균성

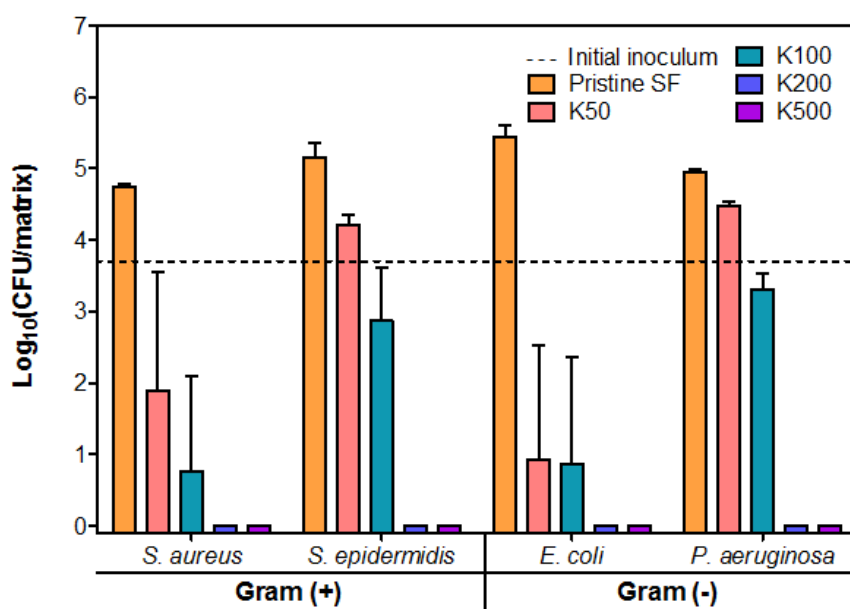


Figure 8. Surface antimicrobial activity of Pristine SF and Cys–KR12–immobilized SF nanofiber matrix measured by modified JIS Z 2801 method.

펩타이드의 특이적인 고정화 방향이 높은 항균성을 나타냈다고 생각된다. 항균성 펩타이드의 양이온성 잔기와 소수성 잔기는 박테리아의 세포막에 침투하는데 중추적인 역할을 담당하기 때문에, 양이온성 잔기는 표면 쪽으로, 소수성 잔기는 바깥쪽으로 향하게 고정화하는 것이 중요하다[105]. 본 실험에 사용한 KR12는 소수성 잔기인 트립토판이 C-말단에 위치하고 있기 때문에(Figure 1), KR12의 N-말단에 티올기를 갖는 시스테인을 도입하여 소수성 잔기를 바깥으로 노출시킬 수 있도록 고정화하였다. 따라서 항균성 펩타이드가 박테리아의 세포막에 보다 더 효과적으로 작용할 수 있도록 N-말단 방향으로 특이적으로 고정화 한 것이 높은 항균성을 나타낸 원인이라 생각된다.

두 번째 요인은 나노섬유 구조와 티올-말레이미드 반응에 의한 높은 고정화 밀도 때문이라 생각된다. 기존 문헌들과 비교해보면 반응 용액의 펩타이드 농도는 거의 유사하나 고정화 밀도는 본 연구에서 대략 10배 정도 높았다. 이처럼 높은 고정화 밀도는 음전하를 띠는 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면을 양전하를 띠게끔 변화시켰으며, 양전하를 띠는 표면이 음전하를 띠는 박테리아 세포막을 정전기적 인력으로 강하게 끌어당김으로써 표면에 고정화되어 있는 Cys-KR12가 박테리아 세포막을 효과적으로 파괴시킬 수 있도록 해주었다[3]. 따라서 항균성 펩타이드의 고정화 밀도를 충분히 증가시킴으로써, 표면에 고정화된 항균성 펩타이드가 효과적으로 박테리아의 세포막을 파괴시켜 높은 항균성을 나타냈다고 생각된다.

4.2.3. 보관 온도에 따른 항균성

항균성 펩타이드를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체를 창상피복재로 사용하기 위해서는, 장기 보관에 따른 항균성의 유지도 중요한 요소이다. 따라서 본 연구에서는 높은 항균성을 보였던 K200에 대해 보관 온도에 따른 항균성을 평가하였다. **Figure 9A**와 **9B**를 통해 확인할 수 있듯이, 4℃에서 보관할 경우에는 3주 이상 보관하더라도 항균성이 떨어지지 않고 유지되는 반면, 37℃에서 보관할 경우에는 대장균에 대한 항균성은 유지되지만 1주일 이후부터 황색포도상구균에 대한 항균성이 떨어지는 것을 확인하였다. 이처럼 보관 온도에 따라 항균성이 떨어지는 원인은 고정화한 항균성 펩타이드가 변성되기 때문이라고 생각된다. 일반적으로 단백질이나 펩타이드는 수용액 상태에서 장기간 보관 시 그 구조가 변하기 때문에, 냉장 또는 냉동 상태로 보관하거나 동결건조하여 보관한다. 따라서 본 연구에서 사용한 Cys-KR12를 고정화하여 창상피복재로 사용할 시, 4℃에서 냉장 보관하여 사용하거나 건조된 형태로 보관하여 사용한다면 항균성을 유지할 수 있을 것이라 생각된다.

4.2.4. 항바이오필름 효과

박테리아가 고체 표면에 부착하게 되면 바이오필름을 형성하게 되는데, 한번 바이오필름이 형성되면 항생제나 면역체계에 의해 쉽게 제거되지 않고 주변 영양소를 뺏아갈 뿐만 아니라 내독소를 분비한다. 따라서 빠른 상처 치유를 위해서는 창상피복재 표면에 바이오필름이 형성되지 않게 하는 것이 중요하다. **Figure 10**은 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 Cys-KR12를 고정화하기

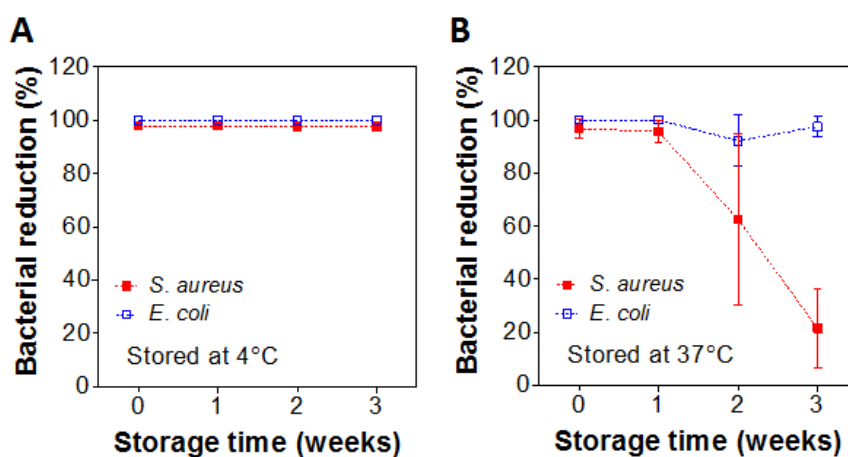


Figure 9. Long-term stability of Cys-KR12-immobilized SF nanofiber matrix at (A) 4°C and (B) 37°C storage. Bacterial reduction (%) was calculated based on CFU of Pristine SF.

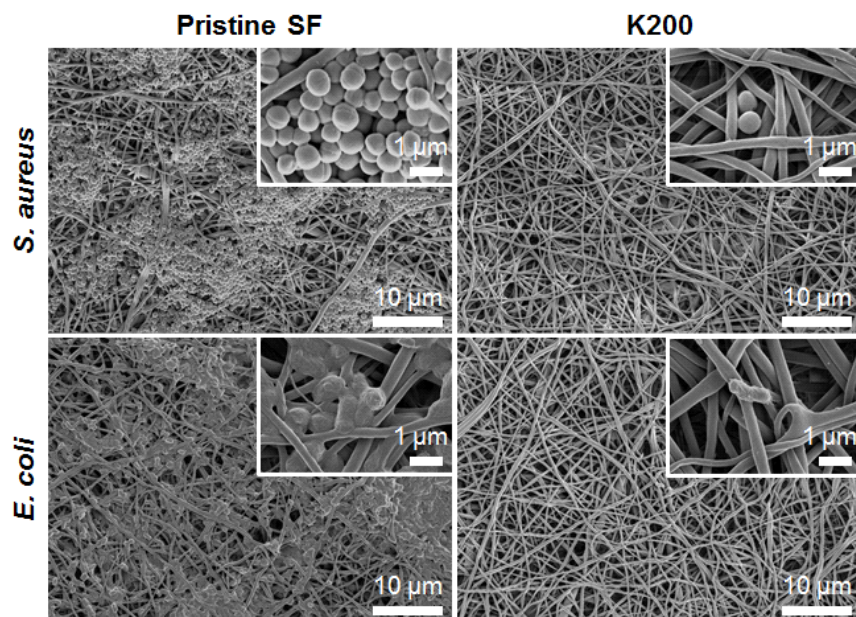


Figure 10. FE-SEM images of 24 h-cultured *S. aureus* and *E. coli* on Pristine SF (left column) and K200 (right column) to observe biofilm formation.

전과 후의 주사전자현미경 사진이다. Cys-KR12를 고정화하지 않은 Pristine SF의 경우 황색포도상구균과 대장균이 바이오필름을 형성하여 나노섬유 지지체 표면을 완전히 덮은 반면, Cys-KR12를 고정화한 K200의 경우 나노섬유 지지체 표면에 부착된 박테리아의 수가 현저히 줄어들었으며, 바이오필름 역시 형성되지 않았다. 따라서 표면에 고정화한 이후에도 Cys-KR12가 바이오필름 형성을 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

4.3. 고정화 항균성 펩타이드가 세포 거동에 미치는 영향

4.3.1. 항균성 펩타이드의 잠재적 세포 독성

Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체가 세포 거동에 미치는 영향을 확인하기 전에, 본 연구에 사용한 Cys-KR12가 가지는 세포 독성을 확인하였다. **Figure 11**에서 확인할 수 있듯이, 각질세포와 섬유아세포 모두 Cys-KR12 용액의 농도가 50 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 낮을 때는 대조군인 TCP와 비교하여 세포 생존율이 유사하거나, 오히려 각질세포의 경우에는 더 높게 나타났다. 반면, Cys-KR12 용액의 농도가 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 높을 때는, 용액의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 낮아져, 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 때는 거의 생존하지 못하였다. 세포 생존율이 50%가 되는 반수치사량은 각질세포의 경우 239.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 섬유아세포의 경우에는 148.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 이는 Cys-KR12의 최소저지농도(4-8 $\mu\text{g/mL}$)에 비하여 약 20~35배 정도 높은 수치이다. 따라서 높은 농도에서는

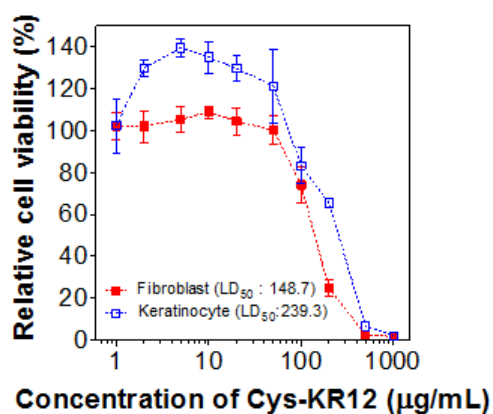


Figure 11. Cytotoxicity of Cys-KR12 on human keratinocyte (HaCaT) and human dermal fibroblast (NHDF) cells measured by MTT assay. Relative cell viability was calculated based on non-treated control. LD50 was calculated by DoseResp sigmoidal curve fitting using Origin software.

Cys-KR12가 세포 독성을 나타내지만, 항균성을 나타내는 농도 범위에서는 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

4.3.2. 각질세포 및 섬유아세포 증식에 미치는 영향

피부 상처의 회복은 표피층의 각질세포와 진피층의 섬유아세포의 증식 및 분화를 통해 이루어진다. 따라서 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체를 창상피복재로 이용하기 위해, 고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 평가하였다. **Figure 12**는 높은 항균성을 보였던 K200과 K500, 그리고 대조군인 Pristine SF에 각질세포(**Figure 12A**)와 섬유아세포(**Figure 12B**)를 10일 동안 배양하였을 때 세포의 대사활성 변화를 측정한 결과이다. 각질세포의 경우 K200과 K500 모두 Pristine SF와 비교하여 1일차보다 세포의 대사활성이 크게 증가하였으며, 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 변화폭이 더 크게 나타났다. 섬유아세포 역시 각질세포와 비슷하게 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 세포의 대사활성 증가폭이 커지는 경향성이 나타났다.

이러한 경향성은 DNA 양을 측정한 결과에서도 동일하게 나타났다. **Figure 13**은 Pristine SF, K200, K500에 각질세포(**Figure 13A**)와 섬유아세포(**Figure 13B**)를 10일 동안 배양하였을 때 DNA 양의 변화를 측정한 결과이다. 표면에 고정화한 Cys-KR12의 양이 증가할수록 각질세포와 섬유아세포 모두 1일차보다 DNA의 양이 크게 증가하였다. 일반적으로 세포의 수가 증가하면 대사활성의 총합과 DNA의 총량이 증가하게 된다. 따라서 대사활성의 증가와 DNA 양의 증가를 통하여, 표면에

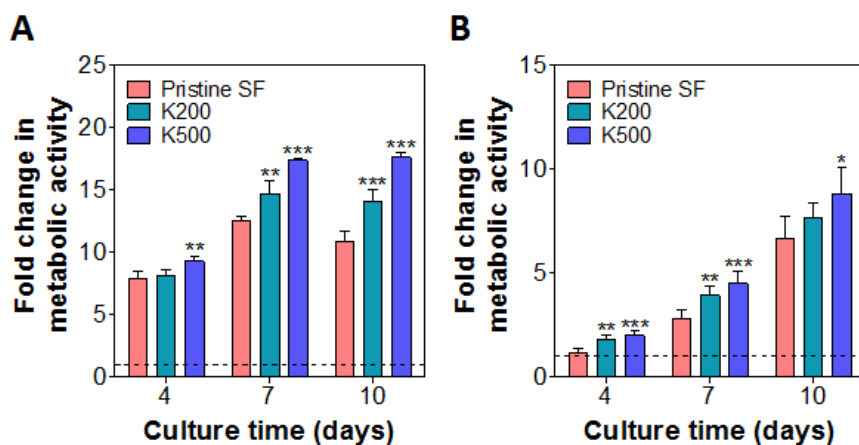


Figure 12. Fold changes in metabolic activity of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: metabolic activity on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF on each day.

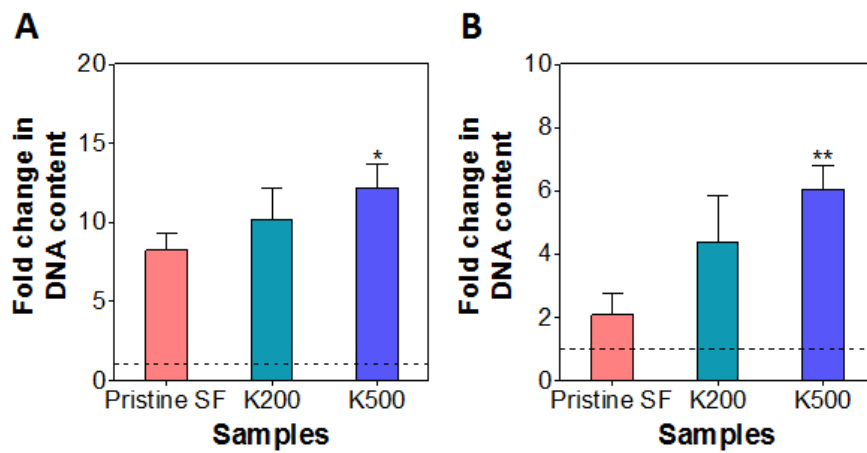


Figure 13. Fold changes in DNA content of (A) human keratinocyte (HaCaT) and (B) human dermal fibroblast (NHDF) cells (1-fold: DNA content on day 1). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF on day 10.

고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식을 촉진시킨다는 것을 확인하였다.

4.3.3. 각질세포 분화에 미치는 영향

표피는 4개의 층으로 구성되는데 안쪽부터 바깥쪽 순으로 기저층(basal layer), 가시층(spinous layer), 과립층(granular layer), 각질층(cornified layer)으로 이루어져있다. 상처가 생기게 되면 안쪽의 기저층이 점차 가시층, 과립층, 각질층으로 분화하게 된다[106]. 따라서 본 연구에서는 과립층의 분화 표지 단백질인 인볼루크린 발현을 통해, 고정화된 Cys-KR12가 각질세포의 분화에 미치는 영향을 평가하였다.

Figure 14는 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체(K200, K500)와 Pristine SF, 그리고 대조군인 TCP 위에 각질세포를 10일간 배양하였을 때, 각질세포에서 발현된 인볼루크린을 웨스턴 블로팅한 결과이다. 대조군 단백질인 베타액틴 대비 인볼루크린이 발현된 양을 비교하였을 때, 실크피브로인 나노섬유 지지체 위에서 배양한 경우 전반적으로 대조군인 TCP보다 인볼루크린이 많이 발현되었으며, 표면에 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 Pristine SF보다 인볼루크린이 상대적으로 많이 발현되었다(**Figure 14B**).

이러한 경향성은 면역형광법을 이용하여 인볼루크린을 염색한 사진에서도 동일하게 나타난다. **Figure 15**에서 볼 수 있듯이, TCP보다는 실크피브로인 나노섬유 지지체를 사용한 경우에 인볼루크린을 나타내는 녹색의 형광강도가 높았으며, 표면에 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 녹색의 형광강도가

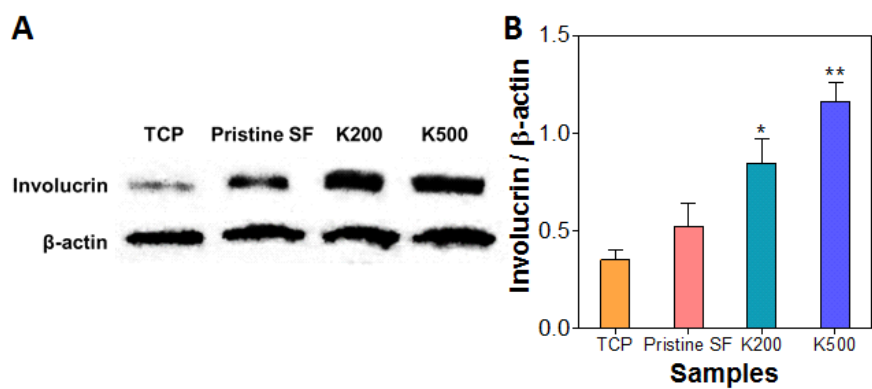


Figure 14. (A) Western blot analysis and (B) normalized amount of expressed involucrin by human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to Pristine SF.

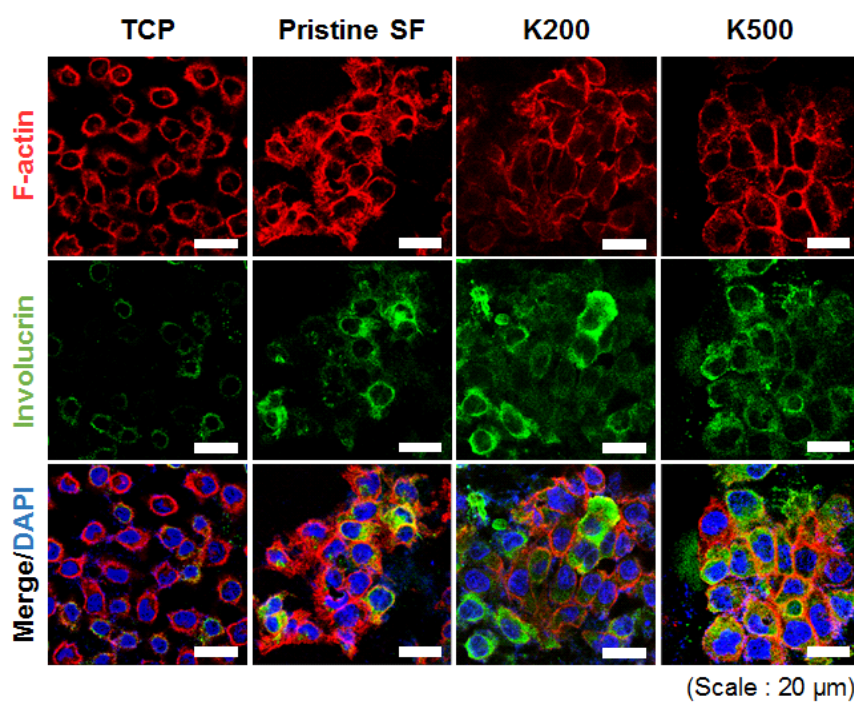


Figure 15. Immunofluorescence images of human keratinocyte (HaCaT) cells cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500. (red: F-actin, green: involucrin, blue: nuclei)

높았다. 또한 F-액틴을 나타내는 빨간색의 형광사진에서 볼 수 있듯이, 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 세포들이 보다 밀접하게 연결되어있으며, 둥근 모양이 아닌 각질화된 형태의 모양을 띠는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 웨스턴 블로팅과 면역형광법 결과를 통해서 표면에 고정화된 Cys-KR12가 각질세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 확인하였다.

LL37은 미토겐 활성화 단백질 인산화효소(mitogen-activated protein kinase, MAPK)군에 속하는 세포외 신호조절 인산화효소(extracellular signal-regulated kinase, ERK)와 p38 인산화효소를 활성화시키고[29, 32], 이를 통해 세포의 이동 및 증식, 분화 등을 조절한다고 알려져 있다[107-109]. 하지만 LL37의 항균성 모티프인 KR12의 세포 증식 및 분화에 관한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 실험에서 표면에 고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진시키는 기작은 명확하게 알 수가 없으나, 아마도 LL37과 유사한 방식으로 세포 활성을 조절할 것이라 짐작해볼 수 있다.

4.3.4. 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향

상처 치유 과정에 있어서 또 다른 중요한 부분 중 하나가 바로 염증 반응이다. 염증 반응은 다양한 인자들에 의해서 일어나는데, 상처 부위에서 일어나는 염증 반응 중 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 지질다당류에 의한 염증 반응이 가장 중요하다. 지질다당류는 박테리아가 죽더라도 혈관을 타고 몸속으로 퍼져 패혈증을 유발하여 몸 전체에서 염증반응일 일으킬 뿐만 아니라

심한 경우에는 사망에 이르게 한다. 또한 지질다당류에 의해 발현되는 염증성 시토카인의 한 종류인 종양괴사인자알파는 기질금속단백질분해효소(matrix metalloproteinase)의 합성을 촉진하고 콜라겐의 축적을 저해하여, 결과적으로 상처 치유를 지연시킨다[2]. 따라서 본 연구에서는 지질다당류에 의한 대식세포의 종양괴사인자알파 발현을 통해, 고정화된 Cys-KR12가 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향을 평가하였다.

Figure 16은 실크피브로인 나노섬유 지지체 위에서 배양한 대식세포에, 지질다당류에 의한 자극을 주었을 때 발현된 종양괴사인자알파의 농도를 효소면역흡착측정법으로 측정한 결과이다. 지질다당류에 의한 자극을 주기 전에는 모든 시료에서 종양괴사인자알파의 농도가 50 pg/mL 이하로 매우 낮게 측정되었다. 하지만, 지질다당류에 의한 자극을 주자 음성대조군인 TCP와 Cys-KR12를 고정화 하지 않은 Pristine SF의 경우 550-720 pg/mL까지 종양괴사인자알파의 농도가 급격하게 증가하였다. 반면, 양성대조군인 용액상태의 Cys-KR12와 실험군인 K200, K500에서는 종양괴사인자알파의 농도가 증가하긴 하였지만, 80-200 pg/mL 수준으로 낮은 수준을 유지하였다. 특히 표면에 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 발현된 종양괴사인자알파의 농도가 낮았다.

LL37이 지질다당류에 의한 종양괴사인자알파의 발현을 억제하는 기작은 대식세포의 지질다당류 수용체인 CD14 수용체에 지질다당류가 결합되는 것을 방해함으로써 이루어진다. 지질다당류는 일반적으로 지질다당류결합단백질을 매개로 CD14 수용체에 결합한 뒤, 톨-유사 수용체4(Toll-like receptor 4,

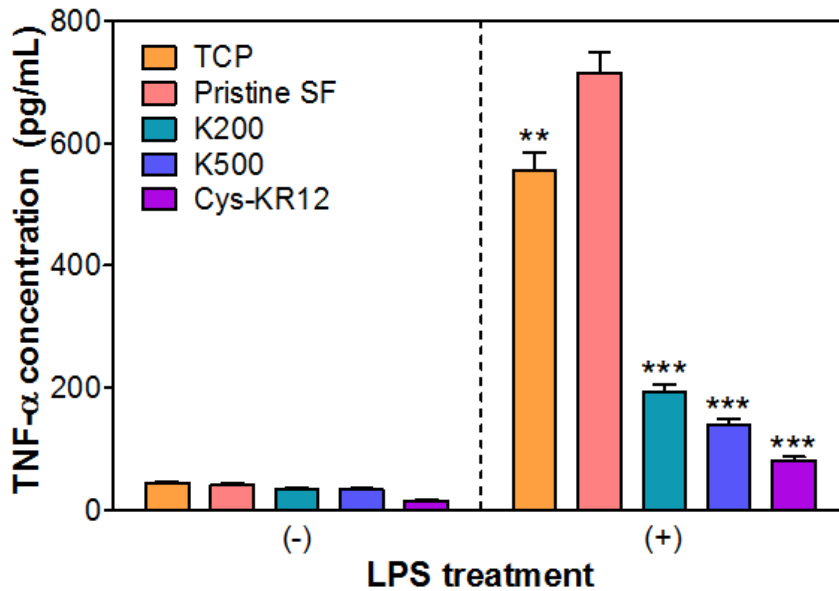


Figure 16. Expression of $\text{TNF-}\alpha$ by mouse macrophage cells (Raw 264.7) stimulated by LPS (10 ng/mL) for 6 h. Cells were cultured on TCP, Pristine SF, K200, and K500 samples prior to LPS stimulation. TCP and Cys-KR12 peptide (20 $\mu\text{g/mL}$) were used as negative and positive control for each. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to Pristine SF after LPS stimulation.

TLR4)와 복합체를 형성하여 엔에프-카파비(Nuclear Factor- κ B, NF- κ B)를 활성화시킴으로써 종양괴사인자알파를 발현시킨다. LL37은 지질다당류와 결합하여 지질다당류를 중화시키거나, 지질다당류결합단백질과 결합하여 CD14와 결합하는 것을 방해하기도 하며, CD14 수용체에 직접 결합하여 지질다당류의 결합을 경쟁적으로 저해함으로써 종양괴사인자알파의 발현을 억제한다[27, 28]. Jacob et al.[24]의 연구 결과에 따르면, 본 실험에서 사용한 KR12 유도체(KR-12-a3)의 경우 지질다당류에 대한 결합력은 낮지만 효과적으로 종양괴사인자알파의 발현을 억제하기 때문에, LL37과 유사한 기작으로 CD14 수용체에 경쟁적으로 결합하여 종양괴사인자알파의 발현을 억제한다고 한다. 따라서 표면에 고정화된 Cys-KR12 역시 대식세포의 CD14 수용체에 경쟁적으로 결합하여 지질다당류가 결합하는 것을 방해함으로써 종양괴사인자알파의 발현을 억제하는 것으로 생각된다.

제 5 장 결 론

본 연구에서는 상처 치유에 있어 다양한 역할을 하는 인간유래 카텔리시딘 펩타이드(LL37)를 창상피복재에 이용하고자, LL37의 항균성 모티프인 Cys-KR12를 전기방사를 통해 제조한 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 고정화하였다. 그리고 이에 따른 표면 특성을 분석하고, 고정화된 Cys-KR12가 항균성 및 세포 거동에 미치는 영향에 대해서 확인하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항균성 펩타이드를 EDC/NHS와 티올-말레이미드 반응을 이용해서 고정화한 결과, 모든 조건에서 90% 이상의 높은 반응 수율을 나타냈으며, 주사전자현미경 사진을 통해 고정화 반응이 나노섬유의 형태학적 구조에 영향을 끼치지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 양이온성의 Cys-KR12를 고정화함에 따라 나노섬유 지지체 표면의 전하가 음전하에서 양전하로 바뀌었으며, 표면의 원소 분석 결과 C-N 결합과 N/C ratio가 증가하였다. 이를 통해 Cys-KR12가 실크피브로인 나노섬유 지지체 표면에 성공적으로 고정화되었음을 확인하였다.
2. 고정화 밀도를 조절하여 그에 따른 항균성을 평가한 결과, 고정화 밀도가 0.60 nmol/cm^2 이상인 K200과 K500에서 병원성 박테리아에 대해 높은 항균성을 나타내었다. 또한 주사전자현미경 사진을 통해 표면에 고정화된 Cys-KR12가 항균성뿐만 아니라 항바이오필름 효과를 나타냄을 확인하였다.

3. 피부를 구성하는 각질세포와 섬유아세포의 세포활성과 DNA 양을 측정한 결과, 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 세포활성과 DNA 양이 1일차보다 크게 증가하였다. 또한 각질세포의 분화 표지 단백질인 인볼루크린의 발현 정도를 측정한 결과, 역시 고정화된 Cys-KR12의 양이 증가할수록 더 많은 양의 인볼루크린이 발현되었다. 이를 통해 표면에 고정화된 Cys-KR12가 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 확인하였다.
4. 그람 음성균의 세포벽 구성물질인 지질다당류에 의한 종양괴사인자알파의 발현 정도를 측정한 결과, 표면에 Cys-KR12를 고정화한 경우 종양괴사인자알파가 거의 발현되지 않았다. 이를 통해 표면에 고정화된 Cys-KR12가 지질다당류에 의한 대식세포의 염증성 시토카인 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.
5. 위의 결과들을 토대로 볼 때, 표면에 고정화된 Cys-KR12는 항균성 및 항바이오필름 효과뿐만 아니라, 피부를 구성하는 각질세포와 섬유아세포의 증식 및 각질세포의 분화를 촉진시키는 효과를 가지며, 지질다당류에 의한 염증성 시토카인의 발현을 억제하는 효과를 갖는다. 이러한 효과는 Cys-KR12의 모태가 된 LL37이 본래 인체에서 가지는 다기능성에 기인하며, 표면에 고정화 한 이후에도 이처럼 다양한 기능성이 유지된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 Cys-KR12를 고정화한 실크피브로인 나노섬유 지지체를 창상피복재로 응용할 수 있으리라 기대된다.

참고문헌

- [1] C. K. Sen, G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner and M. T. Longaker, Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy, *Wound Repair Regen*, **17**, 763–771 (2009).
- [2] R. Edwards and K. G. Harding, Bacteria and wound healing, *Current Opinion in Infectious Diseases*, **17**, 91–96 (2004).
- [3] F. Siedenbiedel and J. C. Tiller, Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles, *Polymers*, **4**, 46–71 (2012).
- [4] G. D. Mogosanu and A. M. Grumezescu, Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, *Int J Pharm*, **463**, 127–136 (2014).
- [5] M. Abrigo, S. L. McArthur and P. Kingshott, Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects, *Macromolecular Bioscience*, **14**, 772–792 (2014).
- [6] C. Vepari and D. L. Kaplan, Silk as a Biomaterial, *Progress in polymer science*, **32**, 991–1007 (2007).
- [7] A. R. Murphy and D. L. Kaplan, Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin, *J Mater Chem*, **19**, 6443–6450 (2009).

- [8] E. S. Gil, B. Panilaitis, E. Bellas and D. L. Kaplan, Functionalized silk biomaterials for wound healing, *Adv Healthc Mater*, **2**, 206–217 (2013).
- [9] Z. G. Wang, L. S. Wan, Z. M. Liu, X. J. Huang and Z. K. Xu, Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview, *J Mol Catal B-Enzym*, **56**, 189–195 (2009).
- [10] J. Kaur, R. Rajkhowa, T. Afrin, T. Tsuzuki and X. Wang, Facts and myths of antibacterial properties of silk, *Biopolymers*, **101**, 237–245 (2014).
- [11] H. Nikaido, Multidrug resistance in bacteria, *Annu Rev Biochem*, **78**, 119–146 (2009).
- [12] T. Thorsteinsson, M. Masson, K. G. Kristinsson, M. A. Hjalmarisdottir, H. Hilmarsson and T. Loftsson, Soft antimicrobial agents: synthesis and activity of labile environmentally friendly long chain quaternary ammonium compounds, *J Med Chem*, **46**, 4173–4181 (2003).
- [13] B. S. Atiyeh, M. Costagliola, S. N. Hayek and S. A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature, *Burns*, **33**, 139–148 (2007).
- [14] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing and H. J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *Int J Food Microbiol*, **144**, 51–63 (2010).

- [15] E. K. Mooney, C. Lippitt, J. Friedman and D. C. Plastic Surgery Educational Foundation, Silver dressings, *Plast Reconstr Surg*, **117**, 666–669 (2006).
- [16] J. W. Loh, G. Yeoh, M. Saunders and L. Y. Lim, Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, **249**, 148–157 (2010).
- [17] V. K. Poon and A. Burd, In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care, *Burns*, **30**, 140–147 (2004).
- [18] M. V. Park, A. M. Neigh, J. P. Vermeulen, L. J. de la Fonteyne, H. W. Verharen, J. J. Briede, H. van Loveren and W. H. de Jong, The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles, *Biomaterials*, **32**, 9810–9817 (2011).
- [19] R. E. Hancock and H. G. Sahl, Antimicrobial and host–defense peptides as new anti–infective therapeutic strategies, *Nat Biotechnol*, **24**, 1551–1557 (2006).
- [20] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, **415**, 389–395 (2002).
- [21] A. Parisien, B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville and C. Q. Lan, Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides, *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 1–13 (2008).
- [22] J. L. Fox, Antimicrobial peptides stage a comeback, *Nat Biotech*, **31**, 379–382 (2013).

- [23] G. Wang, Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles, *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 32637–32643 (2008).
- [24] B. Jacob, I. S. Park, J. K. Bang and S. Y. Shin, Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL-37 possessing both antimicrobial and antiendotoxic activities without mammalian cell toxicity, *Journal of Peptide Science*, **19**, 700–707 (2013).
- [25] B. Mishra, R. F. Epand, R. M. Epand and G. Wang, Structural location determines functional roles of the basic amino acids of KR-12, the smallest antimicrobial peptide from human cathelicidin LL-37, *RSC Adv*, **3**, 19560–19571 (2013).
- [26] D. Vandamme, B. Landuyt, W. Luyten and L. Schoofs, A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide, *Cell Immunol*, **280**, 22–35 (2012).
- [27] Y. Rosenfeld, N. Papo and Y. Shai, Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 1636–1643 (2006).
- [28] N. Mookherjee, K. L. Brown, D. M. Bowdish, S. Doria, R. Falsafi, K. Hokamp, F. M. Roche, R. Mu, G. H. Doho, J. Pistolic, J. P. Powers, J. Bryan, F. S. Brinkman and R.

- E. Hancock, Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37, *J Immunol*, **176**, 2455–2464 (2006).
- [29] G. S. Tjabringa, J. Aarbiou, D. K. Ninaber, J. W. Drijfhout, O. E. Sorensen, N. Borregaard, K. F. Rabe and P. S. Hiemstra, The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor, *J Immunol*, **171**, 6690–6696 (2003).
- [30] J. D. Heilborn, M. F. Nilsson, G. Kratz, G. Weber, O. Sorensen, N. Borregaard and M. Stahle-Backdahl, The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 is Involved in Re-Epithelialization of Human Skin Wounds and is Lacking in Chronic Ulcer Epithelium, *J Invest Dermatol*, **120**, 379–389 (2003).
- [31] S. Tokumaru, K. Sayama, Y. Shirakata, H. Komatsuzawa, K. Ouhara, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, H. Nagai, L. Yang, S. Higashiyama, A. Yoshimura, M. Sugai and K. Hashimoto, Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37, *J Immunol*, **175**, 4662–4668 (2005).
- [32] R. Shaykhiev, C. Beisswenger, K. Kandler, J. Senske, A. Puchner, T. Damm, J. Behr and R. Bals, Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial

- cell proliferation and wound closure, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **289**, L842–848 (2005).
- [33] T. Akiyama, F. Niyonsaba, C. Kiatsurayanon, T. T. Nguyen, H. Ushio, T. Fujimura, T. Ueno, K. Okumura, H. Ogawa and S. Ikeda, The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function, *J Innate Immun*, **6**, 739–753 (2014).
- [34] R. Koczulla, G. von Degenfeld, C. Kupatt, Kr, xF, F. tz, S. Zahler, T. Gloe, Issbr, xFc, K. cker, P. Unterberger, M. Zaiou, C. Lebherz, A. Karl, P. Raake, A. Pfosser, P. Boekstegers, U. Welsch, P. S. Hiemstra, C. Vogelmeier, R. L. Gallo, M. Clauss and R. Bals, An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18, *The Journal of Clinical Investigation*, **111**, 1665–1672 (2003).
- [35] M. Carretero, M. J. Escamez, M. Garcia, B. Duarte, A. Holguin, L. Retamosa, J. L. Jorcano, M. D. Rio and F. Larcher, In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37, *J Invest Dermatol*, **128**, 223–236 (2008).
- [36] R. Ramos, J. P. Silva, A. C. Rodrigues, R. Costa, L. Guardao, F. Schmitt, R. Soares, M. Vilanova, L. Domingues and M. Gama, Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37, *Peptides*, **32**,

- 1469–1476 (2011).
- [37] S. Maher and S. McClean, Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro, *Biochemical Pharmacology*, **71**, 1289–1298 (2006).
- [38] F. F. Han, Y. F. Liu, Y. G. Xie, Y. H. Gao, C. Luan and Y. Z. Wang, Antimicrobial peptides derived from different animals: comparative studies of antimicrobial properties, cytotoxicity and mechanism of action, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **27**, 1847–1857 (2011).
- [39] M. Bacalum and M. Radu, Cationic Antimicrobial Peptides Cytotoxicity on Mammalian Cells: An Analysis Using Therapeutic Index Integrative Concept, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **21**, 47–55 (2015).
- [40] A. Gronberg, L. Zettergren and M. S. Agren, Stability of the cathelicidin peptide LL-37 in a non-healing wound environment, *Acta Dermato-venereologica*, **91**, 511–515 (2011).
- [41] X. Li, P. Li, R. Saravanan, A. Basu, B. Mishra, S. H. Lim, X. Su, P. A. Tambyah and S. S. Leong, Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties, *Acta Biomaterialia*, **10**, 258–266 (2014).

- [42] B. Mishra, A. Basu, R. R. Y. Chua, R. Saravanan, P. A. Tambyah, B. Ho, M. W. Chang and S. S. J. Leong, Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens, *J. Mater. Chem. B*, **2**, 1706–1716 (2014).
- [43] K. Lim, R. R. Chua, H. Bow, P. A. Tambyah, K. Hadinoto and S. S. Leong, Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptide coating with antimicrobial and antibiofilm properties, *Acta Biomaterialia*, **15**, 127–138 (2015).
- [44] G. Gao, D. Lange, K. Hilpert, J. Kindrachuk, Y. Zou, J. T. Cheng, M. Kazemzadeh–Narbat, K. Yu, R. Wang, S. K. Straus, D. E. Brooks, B. H. Chew, R. E. Hancock and J. N. Kizhakkedathu, The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides, *Biomaterials*, **32**, 3899–3909 (2011).
- [45] K. V. Holmberg, M. Abdolhosseini, Y. Li, X. Chen, S. U. Gorr and C. Aparicio, Bio–inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications, *Acta Biomaterialia*, **9**, 8224–8231 (2013).
- [46] W. Lin, C. Junjian, C. Chengzhi, S. Lin, L. Sa, R. Li and W. Yingjun, Multi–biofunctionalization of a titanium surface with a mixture of peptides to achieve excellent antimicrobial activity and biocompatibility, *J. Mater.*

- Chem. B*, **3**, 30–33 (2015).
- [47] X. W. Tan, T. W. Goh, P. Saraswathi, C. L. Nyein, M. Setiawan, A. Riau, R. Lakshminarayanan, S. Liu, D. Tan, R. W. Beuerman and J. S. Mehta, Effectiveness of antimicrobial peptide immobilization for preventing perioperative cornea implant–associated bacterial infection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**, 5229–5238 (2014).
- [48] M. Pedrosa, C. Mouro, F. Nogueira, J. Vaz and I. Gouveia, Comparison of the Antibacterial Activity of Modified–Cotton with Magainin I and LL–37 with Potential as Wound–Dressings, *Journal of Applied Polymer Science*, **131** (2014).
- [49] A. P. Gomes, J. F. Mano, J. A. Queiroz and I. C. Gouveia, Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications, *Carbohydr Polym*, **127**, 451–461 (2015).
- [50] T. D. Heunis, C. Smith and L. M. Dicks, Evaluation of a nisin–eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*–induced skin infections in mice, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 3928–3935 (2013).
- [51] H. J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman and D. L. Kaplan, Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats, *Biomaterials*, **25**, 1039–1047 (2004).
- [52] C. S. Ki, S. Y. Park, H. J. Kim, H. M. Jung, K. M. Woo,

- J. W. Lee and Y. H. Park, Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration, *Biotechnol Lett*, **30**, 405–410 (2008).
- [53] S. Y. Park, C. S. Ki, Y. H. Park, H. M. Jung, K. M. Woo and H. J. Kim, Electrospun silk fibroin scaffolds with macropores for bone regeneration: an in vitro and in vivo study, *Tissue Engineering. Part A*, **16**, 1271–1279 (2010).
- [54] H. H. Kim, J. B. Park, M. J. Kang and Y. H. Park, Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid-dopamine conjugate, *International Journal of Biological Macromolecules*, **70**, 516–522 (2014).
- [55] S. S. Silva, A. Motta, M. T. Rodrigues, A. F. Pinheiro, M. E. Gomes, J. F. Mano, R. L. Reis and C. Migliaresi, Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies, *Biomacromolecules*, **9**, 2764–2774 (2008).
- [56] Y. W. Cheon, W. J. Lee, H. S. Baek, Y. D. Lee, J. C. Park, Y. H. Park, C. S. Ki, K. H. Chung and D. K. Rah, Enhanced chondrogenic responses of human articular chondrocytes onto silk fibroin/wool keratose scaffolds treated with microwave-induced argon plasma, *Artif Organs*, **34**, 384–392 (2010).
- [57] R. Ghassemifar, S. Redmond, Zainuddin and T. V.

- Chirila, Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes, *J Biomater Appl*, **24**, 591–606 (2010).
- [58] O. J. Lee, J. M. Lee, J. H. Kim, J. Kim, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo and C. H. Park, Biodegradation behavior of silk fibroin membranes in repairing tympanic membrane perforations, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, **100**, 2018–2026 (2012).
- [59] B. G. Cha, H. W. Kwak, A. R. Park, S. H. Kim, S. Y. Park, H. J. Kim, I. S. Kim, K. H. Lee and Y. H. Park, Structural characteristics and biological performance of silk fibroin nanofiber containing microalgae spirulina extract, *Biopolymers*, **101**, 307–318 (2014).
- [60] A. R. Park, Y. H. Park, H. J. Kim, M. K. Kim, S. G. Kim, H. Y. Kweon and S. C. Kundu, Tri-layered silk fibroin and poly- ϵ -caprolactone small diameter vascular grafts tested in vitro and in vivo, *Macromol. Res.*, **23**, 924–936 (2015).
- [61] D. Aytemiz, W. Sakiyama, Y. Suzuki, N. Nakaizumi, R. Tanaka, Y. Ogawa, Y. Takagi, Y. Nakazawa and T. Asakura, Small-diameter silk vascular grafts (3 mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge, *Adv Healthc Mater*, **2**, 361–368 (2013).
- [62] B. M. Min, L. Jeong, Y. S. Nam, J. M. Kim, J. Y. Kim

- and W. H. Park, Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, **34**, 281–288 (2004).
- [63] B. M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee and W. H. Park, Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, **25**, 1289–1297 (2004).
- [64] A. Schneider, X. Y. Wang, D. L. Kaplan, J. A. Garlick and C. Egles, Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing, *Acta Biomaterialia*, **5**, 2570–2578 (2009).
- [65] C. R. Yoo, I. S. Yeo, K. E. Park, J. H. Park, S. J. Lee, W. H. Park and B. M. Min, Effect of chitin/silk fibroin nanofibrous bicomponent structures on interaction with human epidermal keratinocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 324–334 (2008).
- [66] D. H. Roh, S. Y. Kang, J. Y. Kim, Y. B. Kwon, H. Y. Kweon, K. G. Lee, Y. H. Park, R. M. Baek, C. Y. Heo, J. Choe and J. H. Lee, Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat, *Journal of Materials Science–Materials in Medicine*, **17**, 547–552 (2006).
- [67] J. H. Kim, B. S. Shin, J. Y. Jeon, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo, H. S. Lee and K. G. Lee, Tetracycline-incorporated

- Silk Fibroin Films, *International Journal of Industrial Entomology*, **25**, 129–132 (2012).
- [68] S. Viju and G. Thilagavathi, Characterization of tetracycline hydrochloride drug incorporated silk sutures, *Journal of the Textile Institute*, **104**, 289–294 (2013).
- [69] Y. Lan, W. Li, Y. Jiao, R. Guo, Y. Zhang, W. Xue and Y. Zhang, Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns, *Acta Biomaterialia*, **10**, 3167–3176 (2014).
- [70] K. J. Ku, Y. H. Hong and K. B. Song, Preparation of a Silk Fibroin Film Containing Catechin and Its Application, *Food Science and Biotechnology*, **17**, 1203–1206 (2008).
- [71] A. R. Lee, J. U. Hong, Y. A. Yang and E. Yi, Dyeing Properties and Antimicrobial Activity of Silk Fabric with Extract of Unripe Citrus Unshiu Fruits, *Fibers and Polymers*, **11**, 982–988 (2010).
- [72] N. Kasoju and U. Bora, Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, **100**, 1854–1866 (2012).
- [73] Y. Lian, J. C. Zhan, K. H. Zhang and X. M. Mo, Fabrication and characterization of curcumin-loaded silk fibroin/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold, *Frontiers of Materials Science*, **8**, 354–362 (2014).

- [74] V. G. Nadiger and S. R. Shukla, Antimicrobial Activity of Silk Treated with Aloe–Vera, *Fibers and Polymers*, **16**, 1012–1019 (2015).
- [75] M. L. Gulrajani, D. Gupta, S. Periyasamy and S. G. Muthu, Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties, *Journal of Applied Polymer Science*, **108**, 614–623 (2008).
- [76] X. Fei, M. Jia, X. Du, Y. Yang, R. Zhang, Z. Shao, X. Zhao and X. Chen, Green synthesis of silk fibroin–silver nanoparticle composites with effective antibacterial and biofilm–disrupting properties, *Biomacromolecules*, **14**, 4483–4488 (2013).
- [77] Z. S. Lu, M. Meng, Y. K. Jiang and J. L. Xie, UV–assisted in situ synthesis of silver nanoparticles on silk fibers for antibacterial applications, *Colloid Surface A*, **447**, 1–7 (2014).
- [78] S. Calamak, E. A. Aksoy, C. Erdogdu, M. Sagiroglu and K. Ulubayram, Silver nanoparticle containing silk fibroin bionanotextiles, *J Nanopart Res*, **17**, 1–9 (2015).
- [79] Z. Lu, J. Xiao, Y. Wang and M. Meng, In situ synthesis of silver nanoparticles uniformly distributed on polydopamine–coated silk fibers for antibacterial application, *Journal of Colloid and Interface Science*, **452**, 8–14 (2015).
- [80] W. C. Jao, M. C. Yang, C. H. Lin and C. C. Hsu, Fabrication and characterization of electrospun silk

- fibroin/TiO₂ nanofibrous mats for wound dressings, *Polymers for Advanced Technologies*, **23**, 1066–1076 (2012).
- [81] Z. X. Cai, X. M. Mo, K. H. Zhang, L. P. Fan, A. L. Yin, C. L. He and H. S. Wang, Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound–dressing applications, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 3529–3539 (2010).
- [82] S. Viju and G. Thilagavathi, Effect of chitosan coating on the characteristics of silk–braided sutures, *Journal of Industrial Textiles*, **42**, 256–268 (2013).
- [83] S. Y. Guang, Y. An, F. Y. Ke, D. M. Zhao, Y. H. Shen and H. Y. Xu, Chitosan/silk fibroin composite scaffolds for wound dressing, *Journal of Applied Polymer Science*, **132** (2015).
- [84] S. Calamak, C. Erdogdu, M. Ozalp and K. Ulubayram, Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials, *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, **43**, 11–20 (2014).
- [85] L. Q. Bai, L. J. Zhu, S. J. Min, L. Liu, Y. R. Cai and J. M. Yao, Surface modification and properties of Bombyx mori silk fibroin films by antimicrobial peptide, *Applied Surface Science*, **254**, 2988–2995 (2008).
- [86] G. L. Chen, M. Y. Zhou, Z. X. Zhang, G. H. Lv, S. Massey, W. Smith and M. Tatoulia, Acrylic Acid Polymer Coatings on Silk Fibers by Room–temperature

- APGD Plasma Jets, *Plasma Processes and Polymers*, **8**, 701–708 (2011).
- [87] P. Wang, Y. Zhou, L. Cui, J. G. Yuan, Q. Wang, X. R. Fan and Y. J. Ding, Enzymatic Grafting of Lactoferrin onto Silk Fibroins for Antibacterial Functionalization, *Fibers and Polymers*, **15**, 2045–2050 (2014).
- [88] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1462**, 1–10 (1999).
- [89] M. Stark, L. P. Liu and C. M. Deber, Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 3585–3590 (2002).
- [90] K. K. Chereddy, C. H. Her, M. Comune, C. Moia, A. Lopes, P. E. Porporato, J. Vanacker, M. C. Lam, L. Steinstraesser, P. Sonveaux, H. Zhu, L. S. Ferreira, G. Vandermeulen and V. Preat, PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing, *Journal of Controlled Release*, **194**, 138–147 (2014).
- [91] I. Lequeux, E. Ducasse, T. Jouenne and P. Thebault, Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide, *European Polymer Journal*, **51**, 182–190 (2014).
- [92] A. Hequet, V. Humblot, J. M. Berjeaud and C. M. Pradier, Optimized grafting of antimicrobial peptides on

- stainless steel surface and biofilm resistance tests, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **84**, 301–309 (2011).
- [93] X. Laloyaux, E. Fautre, T. Blin, V. Purohit, J. Leprince, T. Jouenne, A. M. Jonas and K. Glinel, Temperature-responsive polymer brushes switching from bactericidal to cell-repellent, *Advanced Materials*, **22**, 5024–5028 (2010).
- [94] G. Cado, R. Aslam, L. Seon, T. Garnier, R. Fabre, A. Parat, A. Chassepot, J. C. Voegel, B. Senger, F. Schneider, Y. Frere, L. Jierry, P. Schaaf, H. Kerdjoudj, M. H. Metz-Boutigue and F. Boulmedais, Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide, *Advanced Functional Materials*, **23**, 4801–4809 (2013).
- [95] F. Costa, S. Maia, J. Gomes, P. Gomes and M. C. Martins, Characterization of hLF1–11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity, *Acta Biomaterialia*, **10**, 3513–3521 (2014).
- [96] R. T. Cleophas, J. Sjollem, H. J. Busscher, J. A. Kruijtz and R. M. Liskamp, Characterization and activity of an immobilized antimicrobial peptide containing bactericidal PEG-hydrogel, *Biomacromolecules*, **15**, 3390–3395 (2014).
- [97] R. T. C. Cleophas, M. Riool, H. C. Q. van Ufford, S. A.

- J. Zaat, J. A. W. Kruijtzter and R. M. J. Liskamp, Convenient Preparation of Bactericidal Hydrogels by Covalent Attachment of Stabilized Antimicrobial Peptides Using Thiol–ene Click Chemistry, *Acs Macro Letters*, **3**, 477–480 (2014).
- [98] S. A. Onaizi and S. S. Leong, Tethering antimicrobial peptides: current status and potential challenges, *Biotechnology Advances*, **29**, 67–74 (2011).
- [99] K. H. Lee, C. S. Ki, D. H. Baek, G. D. Kang, D. W. Ihm and Y. H. Park, Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme, *Fibers and Polymers*, **6**, 181–185 (2005).
- [100] P. Ye, Z. K. Xu, J. Wu, C. Innocent and P. Seta, Nanofibrous membranes containing reactive groups: Electrospinning from poly(acrylonitrile–co–maleic acid) for lipase immobilization, *Macromolecules*, **39**, 1041–1045 (2006).
- [101] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli and C. N. Bowman, The Thiol–Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry, *Chemistry of Materials*, **26**, 724–744 (2014).
- [102] M. Bagheri, M. Beyermann and M. Dathe, Immobilization reduces the activity of surface–bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum, *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy*, **53**, 1132–1141 (2009).
- [103] M. Gabriel, K. Nazmi, E. C. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen and A. Zentner, Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity, *Bioconjug Chem*, **17**, 548–550 (2006).
- [104] E. Yuksel and A. Karakecili, Antibacterial activity on electrospun poly(lactide-co-glycolide) based membranes via Magainin II grafting, *Materials science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, **45**, 510–518 (2014).
- [105] K. Hilpert, M. Elliott, H. Jenssen, J. Kindrachuk, C. D. Fjell, J. Korner, D. F. Winkler, L. L. Weaver, P. Henklein, A. S. Ulrich, S. H. Chiang, S. W. Farmer, N. Pante, R. Volkmer and R. E. Hancock, Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity, *Chem Biol*, **16**, 58–69 (2009).
- [106] J. A. Bouwstra, P. L. Honeywell-Nguyen, G. S. Gooris and M. Poncet, Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations, *Prog Lipid Res*, **42**, 1–36 (2003).
- [107] W. Zhang and H. T. Liu, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Res*, **12**, 9–18 (2002).
- [108] T. Efimova, A. M. Broome and R. L. Eckert, A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex

formation, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 34277–34285 (2003).

- [109] G. D. Sharma, J. He and H. E. Bazan, p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 21989–21997 (2003).

Abstract

Multi-functional Silk Fibroin Nanofiber Immobilized with Antimicrobial Motif of Human Cathelicidin Peptide (LL37)

Daewoong Song

Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering

The Graduate School

Seoul National University

In this study, we immobilized antimicrobial motif (Cys-KR12) of human cathelicidin peptide (LL37) on electrospun SF nanofiber matrix using EDC/NHS and thiol-maleimide click chemistry in order to utilize multi-functions of LL37 as wound dressing application. After peptide immobilization, nanofibrous structure was well conserved. Ellman's assay revealed that Cys-KR12 was successfully immobilized on SF nanofiber matrix with high reaction yield (above 90%). As a result of immobilization of

cationic antimicrobial peptide, surface zeta potential was changed from negative to positive. XPS analysis also showed that atomic percent of C–N carbon and N/C ratio increased due to high lysine and arginine content of Cys–KR12.

High bactericidal activity was achieved in K200 and K500 by means of increasing peptide immobilization density above 0.60 nmol/cm². In addition, biofilm was not developed in K200. Furthermore, surface-immobilized Cys–KR12 promoted proliferation of keratinocyte and fibroblast cells with highly differentiated keratinocyte cells and suppressed LPS-induced TNF- α expression of macrophage cells. Consequently, Cys–KR12-immobilized SF nanofiber matrix could be a promising candidate as a wound dressing.

.....
Keywords : silk fibroin, antimicrobial peptide, nanofiber,
wound dressing, immobilization

Student number : 2014–20067